

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC  
UNIDADE ACADÊMICA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNASAU  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**JOELSON CARMONO LEMOS**

**AValiação DO PERFIL INFLAMATÓRIO, INTEGRIDADE  
DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E SEQUELAS  
COGNITIVAS NA VIDA ADULTA EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE MENINGITE NEONATAL POR  
STREPTOCOCCUS AGALACTIAE**

Tese de doutorado apresentada ao  
Programa de Pós Graduação em  
Ciências da Saúde para obtenção do  
título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana  
Barichello

**CRICIÚMA  
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

L557a Lemos, Joelson Carmono.

Avaliação do perfil inflamatório, integridade da barreira hematoencefálica e sequelas cognitivas na vida adulta em modelo experimental de Meningite neonatal por *Streptococcus Agalactiae* / Joelson Carmono Lemos ; orientadora: Tatiana Barichello. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2015.

93 p : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2015.

1. Meningite bacteriana. 2. *Streptococcus agalactiae*  
3. Citocinas. 4. Quimiocinas. 5. Estresse oxidativo. I.  
Título.

CDD. 22ª ed. 616.82



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

## PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pelo candidato **Joelson Carmono Lemos** sob o título “**Avaliação do perfil inflamatório, integridade da barreira hematoencefálica e sequelas cognitivas na vida adulta em modelo experimental de meningite neonatal por streptococcus agalactiae**”, para obtenção do grau de DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese, com conceito B.

Criciúma, SC, 12 de fevereiro de 2015.


  
Prof. Dra. PATRÍCIA FERNANDA SCHUCK  
Membro Relator - UNESC

  
Prof. Dra. JOSIANE BUDNI  
Membro Interno - UNESC

  
Prof. Dr. MARCOS MARQUES DA SILVA PAULA  
Membro Externo - UNESC

  
Prof. Dr. EDUARDO MONGUILHOT DALMARCO  
Membro Externo - UFSC

Prof. Dra. Tatiana Barichello  
Orientadora

  
Prof. Dra. Vanessa Moraes de Andrade  
Coordenadora Adjunta do PPGCS



## **FOLHA INFORMATIVA**

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Microbiologia Experimental, Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense e Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica da Universidade Federal de Minas Gerais em parceria com o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia.



Dedico esse trabalho a minha esposa Fernanda, minhas filhas Juliana e Letícia, a todos os membros do laboratório, que me auxiliaram em todos os momentos e a todos que indiretamente participaram da conclusão desse trabalho.





## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que sempre ilumina meu caminho para um constante aperfeiçoamento.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiana Barichello, pela disposição, dedicação, paciência e estímulo na orientação desta Tese.

A minha esposa, Fernanda Piovesan Lemos e nossas filhas, Juliana e Letícia, que entenderam minha ausência neste período e sempre estiveram ao meu lado.

A colega de Laboratório de Microbiologia Experimental Ana Paula Moreira pelo incentivo e importante colaboração.

As colegas Jaqueline Generoso e Lutiana Simões pela parceria, estímulo e ensinamentos no Laboratório de Microbiologia Experimental.

Aos colegas de Laboratório pela convivência amistosa e enriquecedora, com muito aprendizado no período desta Tese.



*O que deixamos para trás e o que nos espera  
adiante pouco importam se comparados com  
o que existe dentro de nós.*

*Ralph Waldo Emerson*



## RESUMO

A meningite bacteriana é a doença infecciosa mais comum do sistema nervoso central (SNC), caracterizada por uma inflamação das meninges. O *Streptococcus agalactiae* é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em recém-nascidos em todo o mundo, causando sepse, pneumonia e meningite. Sobreviventes a meningite podem sofrer graves sequelas neurológicas a longo prazo. Nosso objetivo foi verificar os níveis de citocina/quimiocina, atividade de mieloperoxidase (MPO), o stress oxidativo e ruptura da barreira hematoencefálica (BHE) no hipocampo e córtex cerebral dos ratos Wistar recém-nascido após indução da meningite por *S. agalactiae* e os efeitos da meningite na vida adulta através de testes comportamentais e níveis de fator de crescimento neuronal (NGF) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Ratos Wistar recém-nascidos, receberam 10  $\mu$ L de solução salina estéril como um placebo ou um volume equivalente de *S. agalactiae* em uma concentração de  $1 \times 10^6$  UFCol/mL. em diferentes tempos após a indução da meningite, os animais foram mortos e o hipocampo e córtex cerebral foram retiradas para avaliação dos níveis das citocinas quimiotática indutora de neutrófilos tipo 1 (CINC-1), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-10 e fator de crescimento tumoral (TNF- $\alpha$ ) e permeabilidade da BHE. Sessenta dias após a indução, os animais foram submetidos a testes comportamentais e mortos, e o hipocampo e no córtex cerebral foram retirados para análise dos níveis de BDNF e NGF. No hipocampo os níveis de CINC-1 foram aumentados em 6 h e 12 h após a indução, IL-1 $\beta$  em 6, 12 e 24 h após, a IL-6 em 6, 24 e 96 h após, de IL-10 às 24, 48 e 96 h após e TNF- $\alpha$  às 24 h e 96 h após. No córtex cerebral os níveis CINC-1 e IL-1 $\beta$  foram encontrados aumentada 6 h após a indução da meningite. A atividade da MPO foi elevado em 24, 48 e 96 h após a indução no hipocampo e em 6, 12, 24, 48 e 96 h após a indução no córtex cerebral A ruptura da BHE teve início em 12 h após a indução. Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram elevados no hipocampo em 6, 12, 24, 48, 72 e em 96 h e no córtex cerebral as 72 e 96 h após a indução da meningite. Os níveis da carbonilação de proteínas foram elevadas no hipocampo e no córtex cerebral em 6, 24, 48, 72 e 96 h após. Houve uma diminuição da atividade da superóxido dismutase (SOD) no hipocampo e no córtex cerebral. A atividade da catalase (CAT) foi



elevada no hipocampo em 6 h e no córtex cerebral de 12 e 96 h após a indução da meningite. O teste campo aberto não demonstrou nenhuma diferença motora, atividade exploratória e memória de habituação entre os grupos. O teste de esQUIVA inibitória, quando avaliamos a memória de longo prazo em 24h após a sessão de treino, verificou-se que o grupo meningite teve uma diminuição na memória aversiva, quando comparado com o teste de memória de longo prazo do grupo sham. Os níveis de BDNF foram diminuídos no hipocampo e córtex cerebral; no entanto, os níveis de NGF diminuíu apenas no hipocampo. Estes resultados sugerem que o modelo de meningite pode ser uma boa ferramenta de pesquisa para o estudo dos mecanismos biológicos envolvidos nas alterações comportamentais secundários da meningite por *S. agalactiae*.

**Palavras chave:** Meningite, *S. agalactiae*, memória, BDNF, citocinas.





## ABSTRACT

Bacterial meningitis is the most common infectious syndrome of the central nervous system (CNS), characterized by inflammation of the meninges. *Streptococcus agalactiae* is a major cause of morbidity and mortality among newborns worldwide, causing septicemia, pneumonia, and meningitis. The survivors meningitis can suffer severe long term neurological damages such as learning and memory disabilities, seizures, and hearing loss. The pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis involve a complex interaction between pathogenic virulence factors and host immune response. Much of the damage caused by this infection can be associated with the release of cytokines in cerebrospinal fluid (CSF). Our goal was to determine the levels of cytokine, myeloperoxidase activity, oxidative stress and disruption of the blood brain barrier in the hippocampus and cortex of newborn rats after contracting *S. agalactiae*, the effects of meningitis in adult behavioral tests, and nerve growth factor (NGF) levels of Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in adult rats that survived meningitis. New born Wistar rats received 10  $\mu$ L sterile saline as a placebo or an equivalent volume of *S. agalactiae* at a concentration of  $1 \times 10^6$  UFCol/mL. The animals were killed and the hippocampus and cortex cerebral were removed for evaluation of cytokine cytokine-induced neutrophil chemoattractant type 1 (CINC-1), interleukin1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) levels and blood brain barrier (BBB) permeability. Sixty days after the induction of meningitis, the animals were subjected to behavioral tests and then killed for the removal of the hippocampus and cortex cerebral on which an analysis of BDNF and NGF levels was conducted. Levels in the hippocampus were increased from CINC-1 to 6 h and 12 h, IL-1 $\beta$  and 6, 12 and 24 h, IL-6 at 6, 24 and 96 h of IL-10 at 24, 48 and 96 h TNF- $\alpha$  at 24 h and 96 h. In the cortex, the CINC-1 and IL-1 $\beta$  levels were found increased at 6 h. The Myeloperoxidase (MPO) activity was significantly elevated at 24, 48 and 98 h in the hippocampus, and at 6, 12, 24, 48 and 96 h in the cortex cerebral. The disruption of the BBB was initiated after 12 h. The Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels were higher in the hippocampus at 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h and the cortex cerebral at 72 and 96 h. The levels of protein carbonylation were higher in the hippocampus and cortex cerebral at 6, 24, 48, 72 and 96 h. There was a



decrease in the superoxide dismutase (SOD) activity in the hippocampus and cortex. The catalase (CAT) activity was higher in the hippocampus than in the cortex cerebral at 6, 12, and 96 h. The open field test didn't show any motor difference, exploratory activity, or habituation between groups. After assessing long term memory 24h after the training session through the inhibitory avoidance test, the meningitis group showed a decrease in aversive memory when compared to the long-term memory test of the sham group. BDNF levels were diminished in the hippocampus and cortex cerebral; however, NGF levels decreased only in the hippocampus. These results suggest that the meningitis model is a good research tool for studying the biological mechanisms involved in the secondary behavioral alterations for meningitis by *S. agalactiae*.

**Keywords:** Meningitis, *S. agalactiae*, memory, BDNF, cytokines.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Fisiopatologia da meningite bacteriana aguda..	31
<b>Figura 2:</b> Representação em horas do tempo de indução da meningite, tratamento e eutanásia dos animais para avaliação das citocinas e quimiocinas.....	46
<b>Figura 3:</b> Representação em horas do tempo de indução da meningite, tratamento e eutanásia dos animais para avaliação da atividade de mieloperoxidase.....	47
<b>Figura 4:</b> Representação em horas do tempo de indução da meningite, tratamento e eutanásia dos animais para avaliação do dano oxidativo e atividade de defesa enzimática.....	48
<b>Figura 5:</b> Representação da indução da meningite, tratamento e morte dos animais para avaliação da integridade da BHEC.....	49
<b>Figura 6:</b> Representação da indução da meningite, tratamento e morte dos animais para testes comportamentais e dosagem do BDNF e NGF 60 dias após a indução da meningite.....	50
<b>Figura 7:</b> Teste de habituação ao campo aberto.....	51
<b>Figura 8:</b> Tarefa de esquivas inibitória.....	52
<b>Figura 9:</b> Curva de Kaplan-Meier em ratos Wistar neonatos inoculados com <i>S. agalactiae</i> .....	54
<b>Figura 10:</b> Níveis de CINC-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ no hipocampo após a indução da meningite por <i>S. agalactiae</i> .....	55
<b>Figura 11:</b> Níveis de CINC-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ no córtex cerebral após a indução da meningite por <i>S. agalactiae</i> .....	56
<b>Figura 12:</b> Níveis de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ no LCR após a indução da meningite por <i>S. agalactiae</i> .....	57
<b>Figura 13:</b> Atividade da mieloperoxidase no hipocampo e córtex cerebral após a indução da meningite por <i>S. agalactiae</i> .....	57
<b>Figura 14:</b> Avaliação da integridade da BHE foi investigada através do extravasamento do corante azul de Evans no hipocampo (A) e córtex (B) cerebral após a indução da meningite por <i>S. agalactiae</i> .....	58
<b>Figura 15:</b> Dano oxidativo e defesa enzimática no hipocampo e córtex após a indução da meningite por <i>S. agalactiae</i> .....	59
<b>Figura 16:</b> Teste de habituação ao campo aberto (A) e esquivas inibitórias (B).....	61
<b>Figura 17:</b> Efeitos da meningite neonatal nos níveis de BDNF (A) e NGF (B) no hipocampo e córtex cerebral em ratos adultos.....	62



## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA: Albumina Sérica Bovina  
BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês, Brain-derived neurotrophic factor)  
BHE: Barreira Hematoencefálica  
BS-LCR: Barreira Sangue-Líquido Cefalorraquidiano  
CAT: Catalase  
CCPD: Centro de Controle e Prevenção de Doenças  
CEC: Células Endoteliais Cerebrais  
CEUA: Comissão de Ética em Uso de Animais  
CINC-1: Citocina Quimiotática Indutora de Neutrófilos tipo 1 (do inglês, Cytokine-induced neutrophil chemoattractant type 1)  
CK: Creatina Cinase (do inglês, Creatine Kinase)  
CXCR2: Receptor Quimiotático Ligado ao receptor 2 (do inglês, chemokine (C-X-C motif) receptor 2)  
DNA: Ácido desoxirribonucleico (do inglês, deoxyribonucleic acid)  
E. coli: Escherichia coli  
ERN: Espécies Reativas de Nitrogênio  
ERRO: Espécies Reativas de Oxigênio  
GPX: Glutathione Peroxidase  
GSH: Glutathione Reduzida (do inglês, glutamate-cysteine ligase)  
H. influenzae: Haemophilus influenzae  
IL: Interleucina  
IRAK-1: Quinase Associada ao Receptor da Interleucina 1 (do inglês, Interleukin-1 Receptor Associated Kinase)  
IRAK-2: Quinase Associada ao Receptor da Interleucina 2 (do inglês, Interleukin-2 Receptor Associated Kinase)  
JA: Junções Apertadas  
JEA: Junções Endoteliais Aderentes  
LCR: Líquido Cefalorraquidiano  
*L. monocytogenes*: *Listeria monocytogenes*  
MAPK: Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (do inglês, Mitogen Activated Kinase Protein)  
MEC: Matriz Extracelular  
MMP: Matriz de Metaloproteinase (do inglês, matrix metalloproteinase)  
MMP-2: Matriz de Metaloproteinase-2 (do inglês, matrix metalloproteinase 2)





MP: Maturação de Polipeptídeo  
MPO: Mieloperoxidase (do inglês, Myeloperoxidase)  
MyD88: Diferenciação Mielóide Primária em Resposta ao Gene 88 (do inglês, Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88)  
N. meningitidis – *Neisseria meningitidis*  
NF- $\kappa$ B: Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (do inglês, Nuclear Factor of Kappa B)  
NGF: Fator de Crescimento Neuronal (do inglês, Nerve Growth Factor)  
PAMP: Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês, Pathogen Associated Molecular Patterns)  
PBS: Solução de Tampão Fosfato (do inglês, Phosphate Buffer Solution)  
PI-3: Prolactina 3 (do inglês, Prolactin)  
PRR: Receptores de Reconhecimento Padrão (do inglês, Pattern Recognition Receptors)  
*S. agalactiae*: *Streptococcus agalactiae*  
*S. pneumoniae*: *Streptococcus pneumoniae*  
SNC: Sistema Nervoso Central  
SNP: Sistema Nervoso Periférico  
SOD: Superóxido Dismutase  
SPSS: Pacote Estatístico de Ciências Sociais (do inglês, Statistical Package for Social Sciences)  
TAK-1: Quinase Ativada-1 (do inglês, Activated Kinase-1)  
TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (do inglês, Thiobarbituric acid reactive substances)  
TGF: Fator de Transformação de Crescimento (do inglês, Transforming Growth Factor)  
TLR: Receptor Toll like (do inglês, Toll like receptor)  
TNF-R1: Receptor 1 de Fator de Crescimento Tumoral (do inglês, Tumor Necrosis Factor Receptor 1)  
TNF-R2: Receptor 2 de Fator de Crescimento Tumoral (do inglês, Tumor Necrosis Factor Receptor 2)  
TNF- $\alpha$ : Fator de Crescimento Tumoral Alfa (do inglês: Tumour Necrosis Factor Alpha)  
TrKB: Tirosina Receptora de Quinase B (do inglês, Tyrosine Kinase Receptor B)  
VEFG: Fator de Crescimento Endotelial Vascular (do inglês, Vascular Endothelial Growth Factor)  
ZO: Zona Occludens



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>278</b>
1.1 MENINGITE.....	28
<b>1.1.1 Epidemiologia .....</b>	<b>28</b>
<b>1.1.2 <i>Streptococcus agalactiae</i> .....</b>	<b>30</b>
1.2 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA .....	34
1.3 CITOCINAS .....	36
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO .....	39
1.5 FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF) E FATOR DE CRESCIMENTO NEURONAL (NGF) .....	41
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	44
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	44
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
3.1 MICROORGANISMO INFECTANTE .....	45
3.2 MODELO ANIMAL DE MENINGITE .....	45
3.3. CURVA DE MORTALIDADE .....	46
3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS .....	46
<b>3.4.1 Citocinas e quimiocinas .....</b>	<b>46</b>
<b>3.4.2 Atividade mieloperoxidase.....</b>	<b>47</b>
<b>3.4.3 Dano oxidativo e atividade de defesa enzimática.....</b>	<b>48</b>
<b>3.4.4 Barreira hematoencefálica.....</b>	<b>48</b>
3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS .....	49
<b>3.5.1 Habituação em campo aberto.....</b>	<b>50</b>
<b>3.5.2 Esquiva Inibitória.....</b>	<b>51</b>
3.6 BDNF E NGF.....	52
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
<b>4.RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
4.1 CURVA DE MORTALIDADE .....	54
4.2 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	54
4.5 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....	60
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>92</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MENINGITE

A meningite bacteriana é a síndrome infecciosa mais comum do sistema nervoso central (SNC) caracterizada por uma inflamação das meninges (Thomas et al., 2002; Van De Beek et al., 2006), afetando a pia-máter, a aracnoide e o espaço subaracnoide (Kim, 2010). As principais características histopatológicas são as extensas inflamações granulocíticas no espaço subaracnoide e ventricular e dano neuronal, afetando principalmente córtex cerebral e hipocampo (Putz et al., 2013). Apesar do uso efetivo de terapia antimicrobiana, sequelas tardias tais como convulsões, surdez, cegueira, deficiência de aprendizado e déficit cognitivo ocorrem em uma significativa parcela dos sobreviventes (Grimwood et al., 2000).

A meningite bacteriana pode ser de difícil diagnóstico, pois frequentemente apresenta sinais e sintomas inespecíficos, especialmente em neonatos e crianças. Os sintomas podem incluir hipertermia, diminuição do apetite, vômitos, letargia e irritabilidade. Os sinais clínicos incluem fontanela abaulada, febre, apneia e convulsões (El Bashir et al., 2003). Em casos mais graves, podem apresentar sinais como coma, convulsões e déficits neurológicos. A gravidade dos sintomas pode ser influenciada por fatores do hospedeiro, tais como idade, anormalidades anatômicas, estado imunológico e agente etiológico (Honda et al., 2009).

Estudos já demonstraram que o hipocampo é uma importante estrutura para o aprendizado e a memória (Jarrard et al., 1982), e que a meningite bacteriana pode causar dano hipocampal, especialmente no giro dentado (Leib et al., 1996). As infecções neonatais por *Streptococcus agalactiae* de início precoce geralmente apresentam quadro clínico de dificuldade respiratória, apneia ou outros sinais de sepse nas primeiras 24 a 48 horas de vida. Em recém-nascidos, os agentes etiológicos mais comuns são *Escherichia coli*, *E. Agalactiae* e *Listeria Monocytogenes*. As síndromes clínicas mais comuns de início precoce são sepse, meningite e pneumonia, (Verani et al., 2010).

### 1.1.1 Epidemiologia

A meningite bacteriana apresenta distribuição mundial e sua expressão epidemiológica depende de fatores como: o agente

infeccioso, a existência de aglomerados populacionais, características socioeconômicas dos grupos populacionais e do clima (Harrison et al., 1998). De modo geral, a sazonalidade da doença caracteriza-se pelo predomínio das meningites bacterianas no inverno e das meningites virais no verão (Harrison et al., 1998).

As infecções por *S. agalactiae* surgiram em países desenvolvidos como patógeno neonatal líder durante a década de 1970. O reconhecimento e tratamento precoce da doença reduziram letalidade de 20-50 % para 5 %, associado principalmente aos avanços nos cuidados neonatais (Phares et al., 2008; Verani et al., 2010).

A partir da década de 1980, o *S. agalactiae* surgiu como principal causa de infecção neonatal, com taxas iniciais de mortalidade de 20 a 50 %, sendo reconhecido como uma das mais importantes causas de infecção uterina materna e sepse (Baltimore, 2007). Mundialmente, estima-se que cerca de 10 a 30 % das gestantes são colonizadas pelo *S. agalactiae* de forma transitória, intermitente ou persistente e que, na ausência de qualquer infecção, 1 a 2 % dos recém-nascidos podem desenvolver a infecção (Schuchat et al., 2004).

A incidência da doença neonatal por *S. agalactiae* de início precoce diminuiu em dois terços após a implementação dos Centros de Controle de Prevenção de Doenças (CCPD) e elaboração de diretrizes para a profilaxia antimicrobiana no intraparto (Verani et al., 2010). *S. agalactiae* e *Escherichia coli* são os principais agentes etiológicos responsáveis por sepse de início precoce nos países desenvolvidos (Moore et al., 2003). Como consequência da realização da cultura vaginorretal e da antibioticoprofilaxia intraparto, nos últimos quinze anos ocorreu um declínio significativo da incidência da doença neonatal precoce por *S. agalactiae* (1,7/1000 nascidos vivos versus 0,34 a 0,37/1000 nascidos vivos nos Estados Unidos) (Verani et al., 2010).

Cerca de 66 % de todos os casos de meningite do grupo de Estreptococos do grupo B foram relatados durante os primeiros 3 meses de vida (Phares et al., 2008), sendo registrados a incidência de 2 a 10 casos de meningite por 100.000 nascimentos (Mace, 2008). Estudos apontam que a colonização acontece frequentemente no contato entre a mãe e o feto no momento do parto (Phares et al., 2008).

Em algumas áreas da África, esta bactéria emerge como uma das mais importantes causa de sepse neonatal e meningite, com incidência desta de 1,8/100 nascidos vivos e apresenta taxa de mortalidade acima de 33 % (Laving et al., 2003). A carga da doença é clara na África-subsaariana (Madhi et al., 2003).

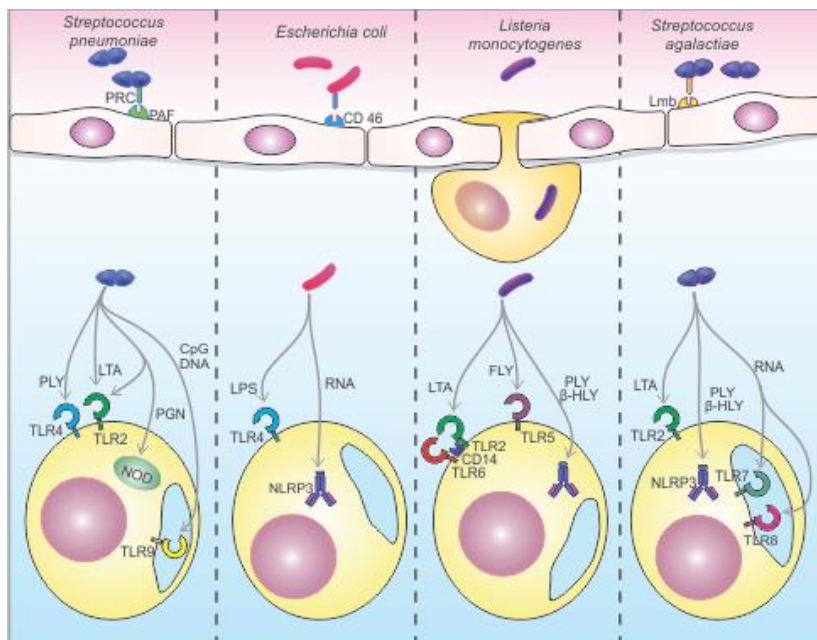
Na Índia, um estudo revelou uma baixa incidência bacteriana por *S. agalactiae* de 0,17 por mil nascidos vivos (Kuruvilla et al., 1999), (Johri et al., 2013). A taxa de letalidade é de 4,5% em países desenvolvidos e de 15% a 50% para os países com baixa renda (De Gans et al., 2002). Em um estudo realizado na Grécia, foi demonstrado que a incidência de *S. agalactiae* como doença invasiva é muito baixa (0,5 %), enquanto que as taxas de colonização maternas atingem cerca de 2,4 a 6,6 % respectivamente (Liakopoulos et al., 2014; Tsolia et al., 2003). No Brasil, embora os dados epidemiológicos ainda sejam fragmentados, não há nenhum estudo que forneça um subsídio em âmbito nacional (Dutra et al., 2014).

### **1.1.2 *Streptococcus agalactiae***

O *S. agalactiae* é uma bactéria Gram-positiva que faz parte da flora da faringe, do trato gastrointestinal e genital. O *S. agalactiae* é classificado sorologicamente com base na constituição da sua parede celular de polissacarídeos: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX (Slotved et al., 2007). Dentre os dez sorotipos conhecidos, o III é o mais encontrado nas doenças neonatais, principalmente meningite e sepse, sendo o segundo mais detectado em amostra vaginal (Verani et al., 2010).

Um grande e diversificado número de proteínas é expresso na superfície do *S. agalactiae*, exercendo diferentes funções, incluindo papel na adesão, invasão, ligação ao ferro, metabolismo intermediário, metabolismo celular, transporte e inibição da fagocitose (Lindahl et al., 2005).

O regulador de síntese capsular (CovRS) é o mais estudado em infecções por *S. agalactiae*, sendo relatados como responsáveis pela modulação da transcrição de até 7% dos genes totais; codificando vários fatores de virulência, incluindo  $\beta$ -hemolisina/citolisina podendo reprimir a transcrição deste utilizando dois sistemas deCovR/CovS (Jiang et al., 2005; Lembo et al., 2010).



**Figura 1:** Fisiopatologia da meningite bacteriana aguda. O micro-organismo adere às células endoteliais e pode romper a BHE e ser reconhecida pelas células apresentadoras de antígeno através da ligação com TLRs. TLRs induzem a ativação de uma cascata inflamatória e expressam numerosas proteínas envolvidas na inflamação e na resposta imune. FLY, flagellin; β-HLY, β-hemolisina; Lmb, laminina lipoproteína; LPS, lipopolissacarídeo; LTA, ácido lipoteicoico PGL, peptidoglycan; PAF, receptor do fator de ativação plaquetária; PLY, pneumolisina; RPC, phosphorylcholine. Barichello *et al.*, 2013.

O *S. agalactiae* está bem adaptado ao trato intestinal e genital, podendo se apresentar como colonização ou invasão, e esta adaptação deve-se a mecanismos de interação entre componentes bacterianos com o sistema imune do hospedeiro (Bauer *et al.*, 2002). A infecção neonatal precoce com menos de sete dias de vida é adquirida verticalmente por meio da exposição ao *S. agalactiae*, presente na vagina da gestante colonizada (Verani *et al.*, 2010).

Estudos na Europa e nos EUA demonstraram que os sorotipos Ia, II, III e V são encontrados em 80-90 % dos casos clínicos isolados, enquanto os sorotipos IV, VI, VII e VIII são raramente observados (Hickman *et al.*, 1999). Estudos de colonização do Japão apresentaram os sorotipos VI e VIII como os mais frequentes



(Lachenauer et al., 1999). Durante os últimos dez anos, o sorotipo V surgiu como um importante sorotipo em infecção neonatal, refletindo as mudanças epidemiológicas em curso e a necessidade de um contínuo controle epidemiológico (Verani et al., 2010).

Muitos adultos são colonizados pelo *S. agalactiae* nos tratos intestinal e genital, mas permanecem assintomáticos. Entretanto, as mulheres colonizadas durante a gravidez apresentam maior risco de parto prematuro e transmissão perinatal (Regan et al., 1996). Mulheres grávidas colonizadas por *S. agalactiae* têm grande importância do ponto de vista clínico, visto suas possíveis implicações para a gestante e o recém-nascido; essa interação entre o patógeno e o hospedeiro têm sido associada com endometrite pós-parto, amnionite, ruptura prematura das membranas ovulares e trabalho de parto prematuro (Yancey et al., 1996). Aproximadamente 10 % a 30 % das mulheres grávidas estão colonizadas com *S. agalactiae* na vagina ou no reto (Verani et al., 2010). Entre os casos de doenças neonatais, que normalmente ocorrem nos 6 primeiros dias de vida, os sinais de infecções sistêmicas, principalmente por *S. agalactiae*, são observados já nas primeiras 24 horas de vida (Schuchat, 1999). No caso dos recém-nascidos, esta colonização por *S. agalactiae* tem sido associada com a infecção neonatal de início precoce (Yancey, 1996). A doença neonatal segue dois padrões, denominados de doença de início precoce e tardio. A infecção neonatal de início precoce, com menos de sete dias de vida, é adquirida verticalmente por exposição ao *S. agalactiae* presente na vagina da gestante colonizada. Podem ocorrer outras complicações maternas como infecções do trato urinário, endometrite, seps e meningite (Phares et al., 2008). Evidências sugerem que a colonização vaginal significativa ( $>10^5$  Unidade Formadora de Colônia/mililitro - UFCol/mL) de *S. agalactiae* durante a gravidez aumenta o risco de transmissão vertical e infecção neonatal de início precoce em recém-nascidos (Ancona et al., 1980).

Os casos de infecção tardia surgem após a primeira semana de vida e são distribuídos de modo uniforme nos primeiros noventa dias de vida. A proliferação bacteriana permite que o *S. agalactiae* colonize a pele ou mucosa do feto para entrar através da aspiração do fluido amniótico (Stevens et al., 2000).

Geralmente, na doença de início tardio, a criança adquire este micro-organismo no momento do parto ou no contato materno nos primeiros dias de vida. No entanto em aproximadamente 50 % dos casos as parturientes apresentavam o *S. agalactiae* do mesmo sorotipo que o presente no neonato (Schuchat, 2001). A invasão por *S. agalactiae* nas

células epiteliais e endoteliais pulmonares permitem que este alcance a corrente sanguínea, causando sepse. Essa disseminação na corrente sanguínea pode levar a meningite e osteomielite. Essa progressão na doença indica que o *S. agalactiae* ultrapassa as defesas imune do hospedeiro, aderir, invadir e transpassar as barreiras celulares (Melin, 2011).

A mortalidade é maior entre os recém-nascidos prematuros, com taxas de letalidade de aproximadamente 20 % a 30 % entre aqueles com  $\leq 33$  semanas de gestação, em comparação com 2 % a 3 % entre os recém-nascidos não prematuros (Schrag et al., 2000). Recém-nascidos, principalmente os prematuros, são particularmente dependentes da competência de seus sistemas imunes inatos para o controle do *S. agalactiae* em suas superfícies de barreira, pois seu sistema imune adaptativo é deficiente em imunoglobulinas G (Bauer et al., 2002). Os sistemas imunes de recém-nascidos prematuros têm uma menor reserva de monócitos e neutrófilos e uma menor produção de citocinas, o que limita a ativação das células T, em comparação com recém-nascidos a termo, o que pode induzir tolerância imunológica levando à redução da função imune do recém-nascido (Melville et al., 2013). A imaturidade do sistema imunológico do recém-nascido contribui para o agravamento da infecção (Schrag et al., 2000). As sequelas decorrentes da meningite bacteriana suscitam a necessidade de pesquisas que possam esclarecer os mecanismos de neuroproteção e na avaliação dos danos provocados por esta patologia.

Efeitos citolíticos e pró-inflamatórios da hemolisina/citolisina do *S. agalactiae* são neutralizados por dipalmitoilfosfatidilcolina, o principal constituinte de fosfolípido do surfactante pulmonar (Nizet et al., 1996), o que explica o aumento do risco de recém-nascidos prematuros, com deficiência de surfactante para que desenvolvam lesão pulmonar e doença invasiva pelo *S. agalactiae*. Durante o contato inicial com a bactéria, vários eventos ocorrem em paralelo. Inicialmente, a bactéria é reconhecida inespecificamente via receptor do complemento, como por exemplo, integrinas e receptores Fc que interagem com os anticorpos opsonizantes ou fatores de ativação do complemento (Putz et al., 2006).

## 1.2 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

O SNC é protegido por três elementos estruturais: a barreira hematoencefálica (BHE), com interface entre o encéfalo e os vasos sanguíneos; a BHE-líquido cefalorraquidiano (BHE-LCR), formada pelo plexo coroide e a membrana aracnoide com os vasos sanguíneos e o líquido cefalorraquidiano (LCR); e a BHE-aracnoide (BHE-A), que é a interface dos vasos sanguíneos com a camada do epitélio da aracnoide subjacente a dura-máter das meninges (Correale et al., 2009). Estas barreiras são estruturas especializadas do SNC que controlam e regulam a homeostase do cérebro, medula espinhal e LCR, juntando aos demais sistemas (Banks, 2009).

A BHE é formada pela presença das junções endoteliais que controlam a abertura e o fechamento coordenado das junções da célula (Stamatovic et al., 2008). Estas junções são compostas de diferentes complexos proteicos, como as junções apertadas (JA) e as junções endoteliais aderentes (JEA), que são os principais reguladores da permeabilidade celular (Bazzoni et al., 2004). As JA são constituídas de três proteínas integrais de membrana denominadas claudina, ocludina e moléculas de adesão juncional e um número de proteínas citoplasmáticas acessórias, incluindo a zona occludens (ZO) ZO-1, ZO-2 e ZO-3 cingulina e outras proteínas guanilato quinase associadas à membrana (Stamatovic et al., 2008). Estas proteínas acessórias conectam as proteínas de membrana à actina para a manutenção da integridade estrutural e funcional do endotélio (Bazzoni et al., 2004).

As JEA possuem proteínas de membrana chamadas caderinas, que se unem com a actina via proteínas intermediárias, denominadas cateninas (a,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), para formar contatos adesivos intercelulares e interatuar com as JA. As células endoteliais cerebrais (CEC) são apoiadas sobre uma lâmina basal que contém moléculas da matriz extracelular cobrindo mais de 90% da superfície das células endoteliais, também estando envolvida na permeabilidade da BHE (Bazzoni et al., 2004).

As ocludinas foram as primeiras proteínas integrais de membrana a serem identificadas nas JA das células endoteliais. A ocludina é uma fosfoproteína de 65 kDa com 4 domínios transmembrana ligados a duas porções extracelulares ricas em tirosina nos domínios intracelulares carboxi e amino terminal. Sua função é atuar como regulador ao invés de como uma proteína estrutural importante no estabelecimento das propriedades da barreira. Seu

domínio citoplasmático carboxi terminal fornece a conexão da ocludina com o citoesqueleto assegurando a alta resistência elétrica das monocamadas das células endoteliais e diminuição da permeabilidade paracelular (Bauer et al., 2010). O principal papel das claudinas é a regulação da seletividade paracelular aos íons pequenos. Para isto, as interações entre as diferentes classes ocorrem de duas maneiras: lateralmente no plano da membrana (interações heteroméricas) ou a ligação cabeça a cabeça entre células adjacentes (interações heterotípica) (Findley et al., 2009).

Os astrócitos no cérebro humano são as células gliais que geralmente superam o número de neurônios por dez vezes, cujos prolongamentos finais formam um rendilhado de lamelas próximo e aderido à superfície externa do endotélio da BHE e à membrana basal, respectivamente (Giaume et al., 2010). Um crescente número de resultados *in vitro* e *in vivo* suportam a ideia de que os astrócitos são células excitáveis e desempenham um papel importante no processamento de informações e modulação da atividade neuronal (Giaume et al., 2010). Neste sentido, o papel dos astrócitos na manutenção e sinalização das células endoteliais da microvasculatura cerebral tem sido estudado na gênese de diferentes doenças e na integridade da BHE (Willis et al., 2004).

O recrutamento e a interação dos pericitos com o endotélio é essencial para a formação, maturação e manutenção da BHE. Os pericitos comunicam-se diretamente com as células endoteliais através das invaginações referidas como peg socket, em que um único pericito pode estar em contato com várias células endoteliais, permitindo uma camada adicional de comunicação e de estabilidade mecânica dos vasos (Armulik et al., 2005). Os pericitos são células cerebrais contráteis que regulam o fluxo sanguíneo capilar, desempenhando um papel importante na manutenção da BHE com a autorregulação e homeostase cerebral (Armulik et al., 2005).

Tem-se determinado, em estudos *in vivo*, que as interações de pericitos com a célula endotelial são críticas para regular a BHE e a ruptura dessas interações pode levar a disfunção desta barreira e a neuroinflamação (Daneman et al., 2010). Além disso, estudos *in vitro* demonstram que os pericitos expressam moléculas como o fator de crescimento endotelial vascular (VEFG) e metaloproteinases de matriz (MMPs) que regulam a integridade da BHE (Thanabalasundaram et al., 2010).

O espaço extracelular representa aproximadamente 20% do volume total do cérebro, sendo preenchido com uma matriz extracelular

(MEC) altamente organizada, localizada na interface entre os vasos sanguíneos e a glia. A MEC parece servir como uma âncora com o endotélio através das interações de proteínas da MEC com os receptores endoteliais tipo integrinas (Bazzoni et al., 2004) que desempenham um papel fundamental na sinalização celular, migração e formação capilar cerebral durante a angiogênese (Zlokovic, 2008). Tais interações célula-matriz podem estimular uma série de vias de sinalização intracelular nas células vasculares, neurônios e células gliais de apoio, além de serem essenciais na BHE participando na manutenção das proteínas endoteliais nas JA (Bazzoni et al., 2004). A quebra da MEC pode levar a alterações no citoesqueleto das células endoteliais da microvasculatura cerebral, que por sua vez afeta as proteínas das JA e a integridade da BHE com o aumento da permeabilidade desta em estados patológicos (Giaume et al., 2010).

De modo que causam a meningite, agentes patológicos interagem com as células endoteliais microvasculares que integram a BHE, consequentemente replicado, resultando na sua quebra (Tenenbaum et al., 2007). Ao ganhar acesso ao SNC, o *S. agalactiae* revela sua capacidade de atravessar a BHE por uma camada especializada de células endoteliais microvasculares cerebrais (BMECs) que regula o tráfego macromolecular para manter a homeostase bioquímica nos tecidos cerebrais (Kim, 2008).

### 1.3 CITOCINAS

O modo de interação do micro-organismo com o sistema imune e a resposta desse contra o agente invasor é um dos mais relevantes mecanismos no estabelecimento de uma infecção (Gerber; Nau, 2010). A defesa do hospedeiro precisa de reconhecimento do micro-organismos e ativação do sistema imunológico. Os receptores do tipo Toll (TLR) reconhecem os fatores bacterianos, ativação microgliais das células e a invasão de leucócitos que promovem a inflamação pela liberação de espécies reativas e metaloproteínases (Gerber et al., 2010). Os TLR funcionam como receptores de reconhecimento padrão (PRR) presentes nos macrófagos, nas células dendríticas e nos neutrófilos (leucócitos), responsáveis pelo reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), os quais são expressos por um amplo espectro de agentes infecciosos, como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Kawai et al., 2010).

Dessa forma, a ativação da imunidade inata a partir da associação PRR e PAMP é um passo importante no desenvolvimento da imunidade adquirida contra os antígenos específicos (Arancibia et al., 2007). Cada TLR tem sua própria via de sinalização e induz respostas biológicas específicas contra micro-organismos. Quando algum PAMP é reconhecido por algum TLR específico, a proteína MyD88 recruta as quinases associadas ao receptor da interleucina-1 (IRAK-1 e IRAK-4) para ativar o fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6). Este ativa o fator de crescimento  $\beta$  associado a cinase 1 (TAK1), que, por sua vez, promove a ativação do complexo IKK formado por duas subunidades catalíticas (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ) e por uma subunidade regulatória (NEMO/IKK $\gamma$ ). Este complexo promove a fosforilação do I $\kappa$ B e a sua degradação resulta no fator de transcrição nuclear (NF- $\kappa$ B), que será translocado ao núcleo para induzir a expressão das citocinas inflamatórias e das moléculas de adesão (Arancibia et al., 2007).

O fator de transcrição NF- $\kappa$ B foi descoberto primeiramente em linfócitos T (Nabel et al., 1987) como um regulador da transcrição da cadeia leve da  $\kappa$ -imunoglobulina, mas está presente em todas as células de mamíferos. O papel mais conhecido e estudado desse fator de transcrição se dá na resposta imunológica, na qual regula expressão de genes essenciais no processo inflamatório e na defesa contra parasitas. Além disso, também atua na sobrevivência e proliferação celular, apoptose e funcionamento do SNC (Xiao, 2004).

Existem duas vias descritas para a ativação nuclear NF- $\kappa$ B, a clássica, que é mais comum e está associada à expressão de genes relacionados à inflamação, à resposta imunológica inata, à anti apoptose e à sobrevivência celular (Arancibia et al., 2002). A via alternativa está associada à expressão de genes que atuam no desenvolvimento e manutenção do órgão linfoides secundários (Alcamo et al., 2002).

As citocinas são um grupo diversificado de polipeptídios, geralmente associados com a inflamação, ativação imunológica e diferenciação ou morte celular. As citocinas são liberadas a partir de vários tipos de células, e podem ser sintetizadas no SNC por microglia, astrócitos, e algumas populações de neurônios. Elas são induzidas em resposta à lesão cerebral e tem diversas ações que podem agravar ou inibir a lesão e reparação celular. Algumas citocinas estimulam a produção de moléculas efetoras importantes, incluindo as citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de crescimento tumoral- alfa (TNF- $\alpha$ ), enquanto outras suprimem a

atividade de citocinas pró-inflamatórias e são chamadas de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10) (Moller et al., 2005).

As citocinas são essencialmente proteínas ou glicoproteínas de baixo peso molecular, a maioria entre 8 e 30 kDa, e podem ser secretadas por diferentes células que mesmo em pequenas quantidades, alteram a função das células-alvo (Gerber et al., 2010; Hopkins, 2003). Agem localmente ou em sítios distantes e podem regular importantes processos biológicos, como crescimento celular, ativação celular, inflamação, imunidade, reparação tecidual, fibrose e morfogênese (Hopkins, 2003). Uma única citocina pode ser produzida por muitos tipos celulares, a expressão da citocina é usualmente induzida, e pode apresentar atividade pleiotrópica, ou seja, uma única citocina pode atuar sobre tipos celulares diferentes (Hopkins, 2003; Klein et al., 2006b). Algumas citocinas são suficientemente estáveis para agir de maneira endócrina, afetando o comportamento de células distantes, embora isso dependa de sua habilidade de penetrar na circulação e de sua meia-vida sanguínea (Janeway et al., 1997).

A patogênese e fisiopatologia da meningite bacteriana envolve uma complexa interação entre fatores de virulência dos patógenos e da resposta imune do hospedeiro. Grande parte dos danos desta infecção pode ser associado à liberação de citocinas no LCR (Moore et al., 2003).

A proliferação de bactérias no interior do espaço subaracnoide estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Muitas células do cérebro tais como células endoteliais, células gliais e macrófagos, podem produzir TNF- $\alpha$ , Interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) e IL-6 em resposta a estímulos bacterianos (Sellner et al., 2010; Van Furth et al., 1996). Após a interação entre o micro-organismo e o hospedeiro, ocorre a resposta defensiva que envolve tantos componentes do sistema imune humoral como do celular. Em condições patológicas, tais como inflamações agudas, crônicas ou dano tecidual, o sistema imune é ativado e ocorre um aumento da produção de macrófagos ou microglia, liberação de citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Janeway et al., 1997) e seus receptores têm sido produzidos pelo próprio SNC, principalmente pelos astrócitos e microglia. Em certas condições, alguns neurônios também são capazes de liberar citocinas (Freidin et al., 1992). As citocinas são induzidas em resposta à lesão cerebral e tem diversas ações que podem causar, agravar, mediar ou inibir a lesão e reparação celular (Allan et al., 2001). A IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória com a capacidade de induzir grande quantidade de genes geralmente não expressos em estados normais de saúde, e aumenta a expressão de quase

todas as outras citocinas, tais como o TNF- $\alpha$  e IL-6 e quimiocinas, bem como moléculas de adesão. O TNF- $\alpha$  age como um estimulante de medula óssea, aumentando o número de células progenitoras mielóides e promovendo a liberação de neutrófilos, resultando em neutrofilia (Vianna et al., 2000).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina composta por 157 aminoácidos e produzida em resposta às lesões inflamatórias, infecciosas ou estimulada por macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células estruturais, tais como fibroblastos e células musculares lisas (Balakumar et al., 2006). O TNF- $\alpha$  tem vários efeitos, incluindo citotoxicidade, atividade antiviral e ativação do fator de transcrição e regulação da resposta imune (Bhardwaj et al., 2003). O TNF- $\alpha$  exerce efeitos através da ligação com receptores específicos denominados Receptor 1 de Fator de Crescimento Tumoral (TNF-R1) e Receptor 2 de Fator de Crescimento Tumoral (TNF-R2) (Gosselin et al., 2007). O TNF-R1 medeia muitas ações do TNF- $\alpha$ , incluindo a produção de citocinas, ativação do NF- $\kappa$ B e apoptose. A ativação do TNF-R1 pode desencadear uma dupla cascata de sinalização que, em diferentes tipos celulares, pode levar a apoptose, proliferação, diferenciação e sobrevivência. Em neurônios e microglia, TNF- $\alpha$  induz apoptose quando se liga ao receptor TNF-R1 (Brietzke et al., 2008). Os ratos e camundongos não produzem interleucina-8 (IL-8), mas apresentam moléculas que são homólogas: Creatina Cinase (KC) e metaloproteinase 2 (MP-2) em camundongos e citocina quimiotática indutora de neutrófilos (CINC-1) em ratos (Watanabe et al., 1989). CINC-1 é equivalente com a IL-8 em humanos e de partes do mesmo receptor quimiocina (C-X-C padrão) do receptor 2 (CXCR2) (Wuyts et al., 1998).

#### 1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de espécies reativas ou em detrimento da remoção desses (Halliwell et al., 2004).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e assim, espécies reativas são produzidos naturalmente por alguma disfunção biológica ou função fisiológica. Essas espécies reativas, cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécies reativas ao oxigênio (ERO) ou espécies reativas ao nitrogênio (ERN) (Pieczenik et



al., 2007). ERO é um termo usado para incluir não apenas ERO, mas também alguns radicais não derivados de oxigênio capazes de gerar radicais livres como, por exemplo o ácido hipocloroso (HCLO) (Halliwell et al., 2004).

Os mecanismos de geração de espécies reativas ocorrem normalmente nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. Tais mecanismos podem, especialmente, ser favorecidos pelos íons ferro e cobre (Pieczenik et al., 2007). A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de radicais livres (Uttara et al., 2009).

Radicais derivados do oxigênio representam as mais importantes espécies que geram radicais em sistemas vivos. As ERO são definidas como moléculas derivadas da redução parcial de oxigênio molecular. São quimicamente reativas com moléculas orgânicas e são citotóxicas, podendo induzir a morte celular neuronal. Estudos já documentaram que as ERO, tais como o radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ),  $H_2O_2$  e hidroxila ( $OH^-$ ) têm um importante papel na fisiopatologia da meningite bacteriana, com o desenvolvimento de complicações intracranianas e danos cerebrais (Kastenbauer et al., 2002; Leib; Täuber, 1999).

Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas, uma delas atua como detoxificadora do agente, antes que ele cause lesão, esta linha é constituída por glutathione reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-peroxidase (GPX) e  $\alpha$ -tocoferol E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathione-redutase (GSH-Rd) e pela GPX, entre outros. Com exceção da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (Uttara et al., 2009).

A CAT é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$ . Sua atividade é dependente de GPX (Scott et al., 1991). A suplementação de CAT exógena previne a oxidação da GSH mediada pelo  $H_2O_2$ , em eritrócitos humanos normais (Scott et al., 1991) e também inibe as lesões oxidativas do DNA de timo à sobrecarga de Ferro ionizado ( $Fe^{+3}$ ) (Cornelis et al., 2011).

A SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariontes, existem duas formas de SOD. A forma Cu,Zn -SOD está presente principalmente no citosol, enquanto que SOD-manganês está localizada primariamente na mitocôndria, esta enzima também tem

papel antioxidante, já que catalisa a dismutação do radical superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , na presença do íon  $H^+$  (Uttara et al., 2009).

O SNC é altamente vulnerável aos efeitos deletérios do estresse oxidativo, devido à presença de ácidos graxos poli-insaturados, que parecem ser alvo das ERO, e por possuírem uma baixa concentração das defesas antioxidantes (Menezes et al., 2011). O estresse oxidativo participa dos processos patológicos, podendo ocasionar dano cerebral, edema cerebral e inflamação das meninges na fase inicial da meningite (Nau et al., 2002). Na meningite bacteriana, a inflamação ocasionada pelo micro-organismo aumenta a produção de leucócitos polimorfonucleares, que provoca a lise celular bacteriana e, simultaneamente, aumentam a liberação de metabólitos proteolíticos como as ERO, resultando em dano endotelial e aumento da permeabilidade da BHE (Kontos et al., 1992; Waggener, 1974).

## 1.5 FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF) E FATOR DE CRESCIMENTO NEURONAL (NGF)

Os fatores de crescimento como as neurotrofinas são moduladores da plasticidade do sistema nervoso. Entre esses fatores de crescimento, o BDNF exerce vários efeitos no SNC, como crescimento, diferenciação e reparo dos neurônios. Dos vários fatores de crescimento, o BDNF é produzido durante toda a vida para preservar as funções essenciais como aprendizagem e memória (Della et al., 2013).

As neurotrofinas, família de fatores neurotróficos, possuem papel importante no controle de morte celular neuronal, no desenvolvimento neuronal e na sua sobrevivência (Bifrare et al., 2005). Esta família desempenha importantes funções na formação do SNC e sistema nervoso periférico (SNP), onde controlam a função sináptica e plasticidade, bem como nos processos de memória e aprendizagem (Yamada et al., 2003). Estudos demonstraram que o BDNF exógeno poderia proteger um grande número de neurônios no córtex cerebral e hipocampo dos danos do processo inflamatório em meningites bacterianas (Li et al., 2007).

O estudo da expressão das neurotrofinas em neurônios tem dado importância especial ao BDNF devido à sua capacidade de modulação da plasticidade sináptica. Os efeitos produzidos pelo BDNF podem variar conforme a fase do desenvolvimento. Na fase fetal, o BDNF é importante para a formação e maturação dos neurônios. Na fase

adulta, tem papel fundamental no processo de consolidação da memória episódica (Post, 2007).

O BDNF tem produção aumentada no ser humano até por volta dos 40 anos, apresentando queda após esta idade (Katoh-Semba et al., 2007). O BDNF é considerado a principal neurotrofina do cérebro, sendo produzido principalmente pelas células da glia e pelos núcleos neuronais. Ele é expresso em múltiplos tipos celulares, no hipocampo, neocórtex, amígdala e cerebelo. Porém sua expressão maior é no SNC promovendo ações de sobrevivência, principalmente em neurônios do hipocampo e córtex cerebral (Ghosh et al., 1994; Lindholm et al., 1996; Saha et al., 2006; Shimizu et al., 2003).

O gene que codifica o BDNF localiza-se no braço curto do cromossomo 11 e tem estrutura genômica complexa, com pelo menos quatro regiões promotoras de sua transcrição. As regiões promotoras são diferentemente distribuídas por regiões cerebrais, tipos celulares e até mesmo estruturas neuronais (Pattabiraman et al., 2005). A regulação gênica do BDNF pode estar alterada por fatores como estresse crônico (Tsankova et al., 2007). O estresse crônico em camundongos resulta em alterações comportamentais, tais como maior reclusão social, revertido somente com tratamento crônico com antidepressivos, e obtendo melhora com o tratamento agudo (Tsankova et al., 2007).

O BDNF tem sido detectado também no sangue com o objetivo de determinar se há correlação de seus níveis com patologias e/ou progressão ou resposta às drogas. Em particular, os níveis de BDNF no cérebro tem sido descritos em várias doenças degenerativas, como Alzheimer; bem como seu aumento tem sido associado a etiologia de várias doenças neuropsiquiátricas como a esquizofrenia, a depressão e transtorno bipolar (Dmitrzak-Weglarz et al., 2008; Sofroniew et al., 2001).

A descoberta dos receptores das neurotrofinas ocorreu várias décadas após a identificação do NGF, e forneceu instrumentos para a busca das rotas controladas pelas neurotrofinas (Ras, Rap-1, Cdc-42-Rac-Rho, Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK), PI-3-kinase (PI3K) e phospholipase-C- $\gamma$ ). Os efeitos neuroprotetores das neurotrofinas não se detêm apenas ao suporte promovido as células, especialmente pela inibição de cascatas apoptótica e ativação dos mecanismos de viabilidade celular (Machado-Vieira et al., 2009)

A cascata de sinalização de MAPK ativa as proteínas ERK1 e ERK2, que vem sendo associadas ao controle da plasticidade sináptica no cérebro adulto, além de ser essencial nos eventos de diferenciação e proliferação celular (Thomas et al., 2004), que por sua vez, estão ligadas

a fenômenos de memória e aprendizagem (Kurino et al., 1995); (Sofroniew et al., 2001). Reduções dos níveis de BDNF têm sido implicados em várias patologias como crises epiléticas, uso de glicocorticóides e hipóxia cerebral (Marini et al., 2007).

O NGF é essencial para o desenvolvimento e manutenção fenotípica dos neurônios no SNP e para a integridade funcional dos neurônios colinérgicos do SNC (Aloe et al., 1997). O NGF é secretado pelos neurônios do hipocampo (Blochl et al., 1995) e assim como outras neurotrofinas, fornece transmissão intracelular através da interação com receptores da superfície celular (Segal et al., 1996); a ligação específica do NGF a neurotrofina de receptores acoplados a tirosina quinase, conduz a dimerização e autofosforilação de quinase molecular (Segal et al., 1996).

O NGF tem, entre outras funções, promove as funções e sobrevivência dos neurônios colinérgicos (Hohsfield et al., 2013). Estudos vem mostrando evidências que o NGF estimula a função celular neuronal, melhorando a função cognitiva (Capsoni et al., 2010). O NGF é sintetizado pelos alvos celulares de inervação. Como a epiderme que produz quantidade significativa de NGF durante a sua inervação inicial e continua a produção basal em adultos. O aumento da expressão de NGF previne a perda neuronal e facilita a regeneração (Aloe et al., 1997).

Os receptores de neurotrofina são expressos em várias células do sistema imunológico, incluindo mastócitos, células T, células B e macrófagos (Nassenstein et al., 2003). As células imunes do sistema hematopoiético também produzem e utilizam NGF. Os níveis de NGF aumentam em nervos danificados e a elevação da expressão dessa proteína está relacionada à presença de interleucinas, principalmente a IL-1, liberada por macrófagos que são atraídos para o sítio da lesão. Os Receptor de Tirosina Quinase B (TrKA) são atraídos para o sítio da lesão, e estes TrKA de alta afinidade para NGF estão presentes em 50% de todos os neurônios não mielinizados (Madduri et al., 2009).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os níveis de mediadores pró-inflamatórios, integridade da BHE no neonatal e parâmetros comportamentais na idade adulta em ratos Wistar adultos sobreviventes à meningite neonatal por *S. agalactiae*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar através da curva de Kaplan-Meier a sobrevivência de ratos Wistar após a indução da meningite neonatal por *S. agalactiae*;
- Avaliar os níveis de CINC-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  no hipocampo, córtex cerebral e LCR de ratos Wistar neonatos após a indução da meningite por *S. agalactiae*;
- Avaliar a atividade da mieloperoxidase no hipocampo e córtex cerebral de ratos Wistar neonatos após a indução da meningite por *S. agalactiae*;
- Avaliação do dano oxidativo e defesa enzimática no hipocampo e córtex cerebral de ratos Wistar neonatos após a indução da meningite por *S. agalactiae*;
- Avaliar a integridade da BHE por extravasamento de azul de Evan's no hipocampo e córtex cerebral de ratos Wistar após a indução da meningite neonatal por *S. agalactiae*;
- Avaliar a aprendizagem e a memória de ratos Wistar adultos induzidos à meningite por *S. agalactiae* no período neonatal.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MICROORGANISMO INFECTANTE

O sorotipo III de *S. agalactiae* foi cultivado em 10 mL de meio de cultura em caldo Todd Hewitt. A cultura foi centrifugada por 10 minutos e ressuspensa em solução salina na concentração de  $1 \times 10^6$  UFCol/mL. O tamanho do inóculo foi confirmado por cultura quantitativa (Barichello; Belarmino; et al., 2010a; Irazuzta et al., 2002).

#### 3.2 MODELO ANIMAL DE MENINGITE

Foram utilizados ratos Wistar neonatos machos (15-20 g) de 3-4 dias de vida, provenientes da colônia de criação do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) com protocolo de número 55/2010 (ANEXO) da UNESC, Brasil. Todos os procedimentos cirúrgicos e inoculações bacterianas foram realizadas sob anestesia, composta de uma administração intraperitoneal de cetamina (6,6 mg/kg), xilazina (0,3 mg/kg) e acepromazina (0,16 mg/kg) (Barichello et al., 2009). Os animais foram submetidos a uma punção na cisterna magna com uma agulha 23. Cada animal recebeu 10 µL de solução salina estéril (Sham) ou uma quantidade equivalente de suspensão de *S. agalactiae* a uma concentração de  $1 \times 10^6$  UFCol/mL e foram posteriormente recolocados em suas gaiolas (Barichello; Pereira; et al., 2011; Trampuz et al., 2007). A meningite foi documentada por uma cultura quantitativa de 5 µL de LCR obtidos por uma punção da cisterna magna 18 horas após a inoculação (Barichello; Belarmino; et al., 2010a), nos animais que não foram mortos anteriormente a este tempo. A morte dos animais se deu por decaptação, e as amostras hipocampo e cortex cerebral foram retiradas e armazenadas a  $-80^{\circ}$  Celcius para dosagens bioquímicas. A retirada do LCR ocorreu anteriormente a decaptação, onde os animais recebiam uma punção na cisterna magna, e o mesmo foi armazenado para as dosagens bioquímicas. Os animais que foram submetidos aos testes comportamentais na vida adulta, receberam tratamento com antimicrobiano (ceftriaxona 100 mg/kg, i.p) duas vezes ao dia, durante 7 dias, ainda na fase neonatal, o que garantiu sua sobrevivência até a fase adulta (Grandgirard; Oberson; et al., 2010; Kim, 2010).

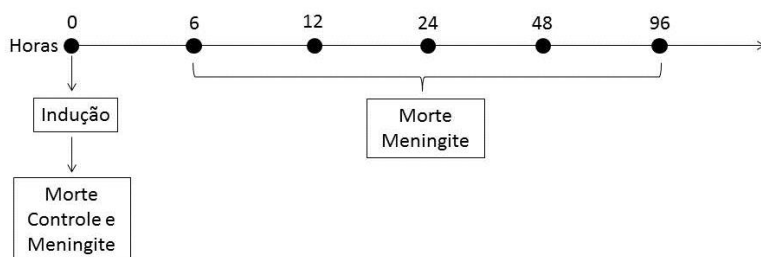
### 3.3. CURVA DE MORTALIDADE

Tento em vista que pacientes com meningite aguda apresentam alta taxa de mortalidade, em torno de 30 a 40%, foi demonstrada a sobrevivência dos animais, que foi analisada através da curva de Kaplan–Meier, incluindo todos os animais infectados no momento da indução até 96 h após (n = 38 animais).

### 3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

#### 3.4.1 Citocinas e quimiocinas

Para avaliação das expressões de CINC-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ , os animais foram divididos em grupo controle e grupo meningite. O grupo meningite foi subdividido em diferentes tempos de morte 0, 6, 12, 24, 48 e 96 h após a indução da meningite por *S. agalactiae* (n = 5 - 6 animais em cada grupo), e as estruturas hipocampo, córtex cerebral e LCR retiradas por depactação e punção da cisterna magna para dosagens.



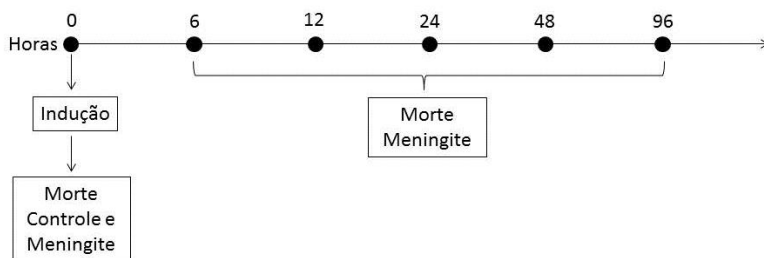
**Figura 2:** Representação em horas do tempo de indução da meningite, tratamento e eutanásia dos animais para avaliação das citocinas e quimiocinas. Fonte: Laboratório de Microbiologia Experimental – UNESC.

Para as dosagens, as estruturas hipocampo, córtex cerebral e LCR foram homogeneizadas em solução de extração (100 mg de tecido por 1 mL) contendo: 0,4 mol/L de NaCl, 0,05% de Tween 20, 0,5% de albumina sérica bovina (BSA), 0,1 mmol/L de fluoreto de fenil metil sulfonil, 0,1 mmol/L de cloreto de benzetônio, 10 mmol/L de EDTA e 20 de KI a aprotinina, utilizando Ultra-Turrax (Fisher Scientific,

Pittsburgh, PA). O homogenato de cérebro foi centrifugado a 3000 x g durante 10 min a 4 °C, e os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a - 20 °C. A concentração de citocinas e quimiocina foi determinada utilizando a metodologia de enzima e um ensaio de ELISA. Os sobrenadantes do tecido cerebral e do LCR foram dosados em uma configuração de ELISA utilizando anticorpos comercialmente disponíveis, de acordo com os procedimentos fornecidos pelo fabricante (R & D Systems, Minneapolis, MN). Os níveis de BDNF foram avaliados como descrito anteriormente (Barichello et al., 2012; Frey et al., 2006), utilizando o ensaio imunoenzimático, utilizando-se kits comerciais de acordo com as instruções do fabricante (Chemicon, EUA). Os resultados são mostrados em pg/100 µL de LCR e pg/100 mg de tecido cerebral.

### 3.4.2 Atividade mieloperoxidase

Para avaliação da atividade da mieloperoxidase os animais foram divididos em grupo controle e grupo meningite (n = 5 - 6) que foram submetidos a diferentes tempos de mortes 6, 12, 24, 48 e 96 h, e as estruturas hipocampo e córtex cerebral foram retiradas para avaliação.



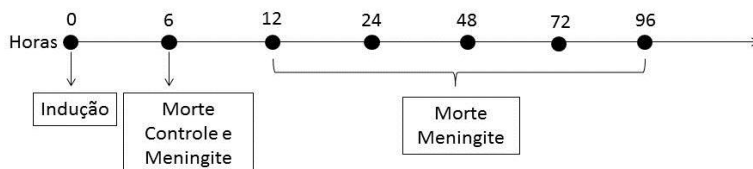
**Figura 3:** Representação em horas do tempo de indução da meningite, tratamento e eutanásia dos animais para avaliação da atividade de mieloperoxidase. Fonte: Laboratório de Microbiologia Experimental – UNESC.

Os tecidos foram homogeneizados (50 mg/mL) em 0,5% de hexadeciltrimetilamônio brometo e centrifugado a 15.000 g durante 40 min. A suspensão foi então sonicada três vezes durante 30 s. Uma parte do sobrenadante foi misturado com solução de tetrametilbenzidina 1,6 mM e 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A atividade foi medida espectrofotometricamente, como a variação de absorvância a 650 nm a 37 °C (Barichello;Lemos; et al., 2011).



### 3.4.3 Dano oxidativo e atividade de defesa enzimática

Os animais foram divididos em grupo controle e grupo meningite (n = 5 - 6), mortos em diferentes tempos após a indução da meningite: 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h. E as estruturas hipocampo e córtex cerebral retiradas para dosagens.



**Figura 4:** Representação em horas do tempo de indução da meningite, tratamento e eutanásia dos animais para avaliação do dano oxidativo e atividade de defesa enzimática. Fonte: Laboratório de Microbiologia Experimental – UNESC.

#### - Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS):

Como índice de peroxidação lipídica foi medido TBARS durante uma reação ácida aquecida como previamente descrito (Draper et al., 1990). Brevemente, as amostras obtidas foram misturadas com 1mL de ácido tricloroacético 10% e 1ml de ácido tiobarbitúrico, fervidas por 15 minutos e após a quantidade de TBARS foi determinada pela absorbância em 535 nm.

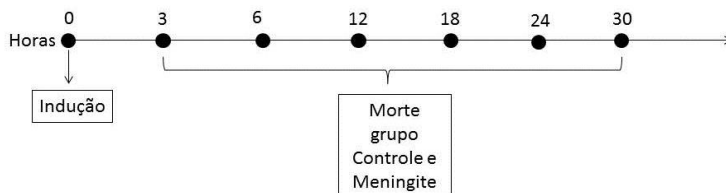
**- Medida dos níveis do grupo carbonil:** O dano oxidativo em proteínas foi determinado pela medida de grupos carbonil conforme previamente descrito (Levine et al., 1990). As amostras obtidas foram precipitadas e as proteínas dissolvidas com dinitrofenilidrazina. Os grupamentos carbonil foram medidos pela absorbância em 370nm.

**- Atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT):** A atividade da CAT foi determinada medindo a taxa de decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio em 240 nm conforme previamente descrito (Aebi et al., 1984; Bannister et al., 1987). A atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente conforme previamente descrito (Lissi et al., 1995).

### 3.4.4 Barreira hematoencefálica

Para a avaliação da integridade da BHE os animais foram divididos em grupo controle e grupo meningite e sofreram eutanásia em

diferentes tempos 3, 6, 12, 18, 24 e 30 h após a indução da meningite por *S. agalactiae*, com um  $n = 5 - 6$  animais por grupo. As estruturas hipocampo e córtex cerebral foram retiradas posteriormente para avaliação.



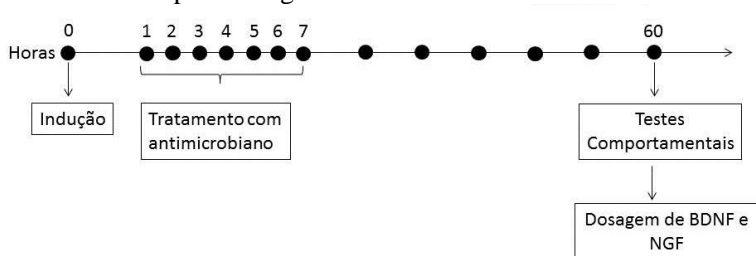
**Figura 5:** Representação da indução da meningite, tratamento e morte dos animais para avaliação da integridade da BHE. Fonte: Laboratório de Microbiologia Experimental – UNESC.

A integridade da BHE foi investigada através do extravasamento do corante azul de *Evans* (Koracevic et al., 2001). Os animais foram anestesiados, com uma dose intraperitoneal de cetamina (6,6 mg/kg), xilazina (0,3 mg/kg) e acepromazina (0,16 mg/kg) (Hirst et al., 2004; Koracevic et al., 2001; Lindahl et al., 2005), e então administrado por via intravenosa através da veia femoral 1 mL de azul de *Evans* (1%) duas horas antes de serem mortos (Leib et al., 1996) e em seguida o tórax foi aberto e o cérebro perfundido com 200 mL de solução salina através do ventrículo esquerdo na pressão de 100 mm Hg até que o fluido de perfusão incolor fosse obtido a partir do átrio direito. As amostras foram pesadas e colocadas em 50% de solução com ac. tricloroacético. Após homogeneização e centrifugação, o corante extraído foi diluído com etanol (1:3), e determinada a sua fluorescência (excitação em 620nm e emissão a 680 nm). O teor de azul de *Evans* no tecido foi quantificado a partir de uma linha padrão linear derivada de quantidades conhecidas do corante e expressa por grama de tecido (Schaper et al., 2002).

### 3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

Para a realização dos testes comportamentais os animais foram divididos em grupo controle e grupo meningite com um  $n = 10 - 12$  animais por grupos. Após 60 dias da indução da meningite por *S. agalactiae*, no período neonatal, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de habituação ao campo aberto e esquiava

inibitória e em seguida mortos e as estruturas hipocampo e córtex cerebral retiradas para dosagens de BDNF e NGF.



**Figura 6:** Representação da indução da meningite, tratamento e morte dos animais para testes comportamentais e dosagem do BDNF e NGF 60 dias após a indução da meningite. Fonte: Laboratório de Microbiologia Experimental – UNESC.

### 3.5.1 Habituação em campo aberto

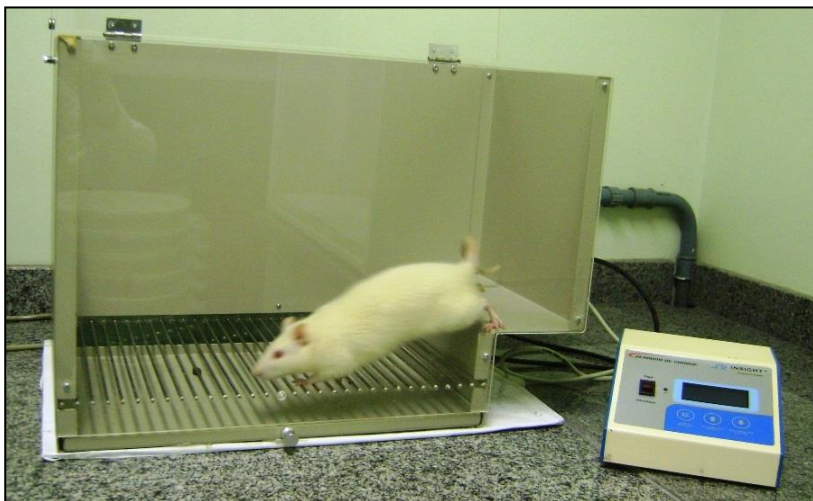
Habituação a campo aberto foi realizado em um aparato de 40 x 60 cm rodeado por paredes de 50 cm de altura sendo 3 paredes de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto foi dividido em 9 retângulos iguais por linhas pretas, figura 7. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrante traseiro esquerdo, e deixado a explorar o campo por 5 min (sessão de treino). Imediatamente após isso, os animais foram levados de volta para a sua gaiola e 24 h mais tarde, submetidos a uma sessão de campo aberto semelhante (sessão de teste). Cruzamento das linhas pretas e levantamentos realizada em ambas as sessões foram contados. A diminuição do número de cruzamentos e levantamentos entre as duas sessões foi tomado como uma medida da retenção de habituação (Vianna et al., 2000).



**Figura 7:** Teste de habituação ao campo aberto. Fonte: Laboratório de Neurociências, UNESC.

### 3.5.2 Esquiva Inibitória

A tarefa de esquiva inibitória foi realizada em uma caixa de acrílico na qual o piso é formado por barras paralelas de metal (1 mm de diâmetro). Os espaços entre as barras medem 1 cm. Uma plataforma com 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento é colocada junto à parede esquerda do aparelho (Quevedo et al., 1999; Roesler et al., 2004; Roesler et al., 2003), figura 8. Na sessão de treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e mede-se o tempo que o animal leva para descer com as quatro patas da plataforma. Esse tempo é denominado latência. Imediatamente após descer da plataforma (com as 4 patas), o animal recebeu um choque de 0,4 mA durante 2 segundos. Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e medido o tempo que ele levou para descer (latência), porém não foi administrado o choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória (Bevilaqua et al., 2003; Izquierdo et al., 1998).



**Figura 8:** Tarefa de esquiva inibitória. Fonte: Laboratório de Neurociências/UNESC.

### 3.6 BDNF E NGF

Para a avaliação dos níveis de BDNF e NGF os animais foram divididos em grupo meningite e grupo controle, foi utilizado um  $n = 10$  animais por grupo. Os animais foram mortos 60 dias após a indução da meningite por *S. Agalactiae* no período neonatal, após a realização das tarefas comportamentais.

Os níveis de BDNF e NGF foram mensurados como previamente descrito (Barichello;Savi; et al., 2010)(Frey, 2006) utilizando o ensaio ELISA, utilizando kits de acordo com as instruções do fabricante (Chemicon, EUA) foram homogeneizadas estruturas cerebrais em solução de tampão fosfato (PBS) com um fluoreto mfenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM e etileno-glicol-bis (2-aminoetileno)-N,N',N'- tetracético (EGTA). As placas de microtitulação (96 cavidades de fundo plano) foram revestidas durante 24 h, com as amostras diluídas 1:2 em diluente de amostra e a curva padrão variou de 7,8-500 pg de BDNF ou NGF. Em seguida, as placas foram lavadas quatro vezes com diluentes de amostra. Anticorpo de coelho monoclonal anti BDNF ou anticorpomonoclonal anti-NGF diluído a 1:1000 em diluente da amostra foi incubada durante 3 h à temperatura ambiente. Depois da lavagem, uma segunda incubação com anticorpo monoclonal de coelho de

anticorpo peroxidase conjugado diluído de 1:000 por uma hora em temperatura ambiente foram transportados para fora. Após adição da enzima estreptavidina, o substrato e solução bloqueadora e quantidade de BDNF ou NGF foram determinada por absorvância a 450 nm. A curva padrão demonstrou uma relação direta entre a densidade óptica (OD) e concentração de BDNF e NGF. A proteína total foi medida pelo método Lowry de (1951) utilizando albumina de soro bovino como padrão (Lowry et al., 1951).

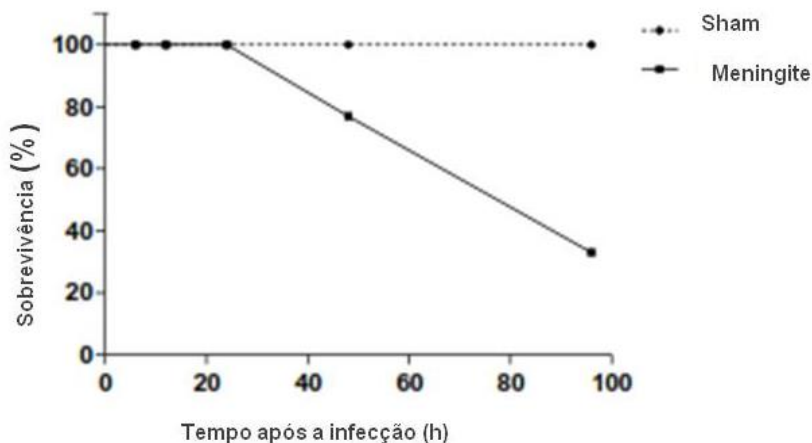
### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação das citocinas, quimiocinas, mieloperoxidase, dano oxidativo, defesa enzimáticos e permeabilidade da BHE foi utilizado um n de 5-6 animais por grupo. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguindo-se testes post-hoc segundo o método de Student-Newman-Keuls. Os dados do BDNF e NGF foram analisados com o teste t de Student e a variáveis foram mostrados por média  $\pm$  SEM de 10 animais em cada grupo. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls post hoc. No teste de habtuação ao campo aberto os grupos foram comparados pelo teste t de Student para amostras independentes. As diferenças entre as sessões de treinamento e teste, dentro de cada grupo foram analisados pelo teste t de Student pareado. Dados do teste de habituação ao campo aberto foram relatados como média  $\pm$  SEM. Na esQUIVA inibitória, grupos foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. As diferenças entre as sessões treino e teste foram analisados pelo teste de Wilcoxon. Os dados obtidos na esQUIVA inibitória são relatados como mediana  $\pm$  com intervalos interquartil (25 e 75). Os valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos

## 4.RESULTADOS

### 4.1 CURVA DE MORTALIDADE

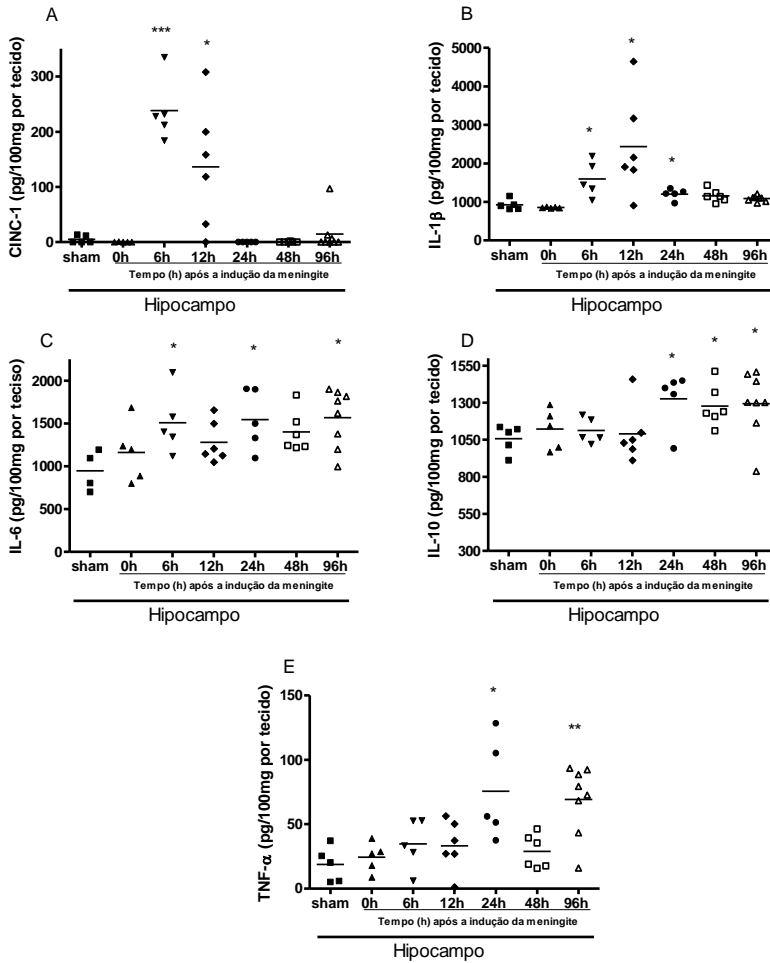
A taxa de sobrevivência foi avaliada por meio da curva de Kaplan-Meier (Figura 9), que incluía todos os animais desde o momento da infecção bacteriana até a 96 h após (n=38). A partir das 48 h até o tempo de 96 h, 67,03 % dos animais morreram pela infecção, sendo que os que sobreviveram por esse tempo foram mortos.



**Figura 9:** Curva de Kaplan-Meier em ratos Wistar neonatos inoculados com *S. agalactiae*. Os resultados são expressos como percentagem de sobrevivência ao longo tempo com a morte espontânea.

### 4.2 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

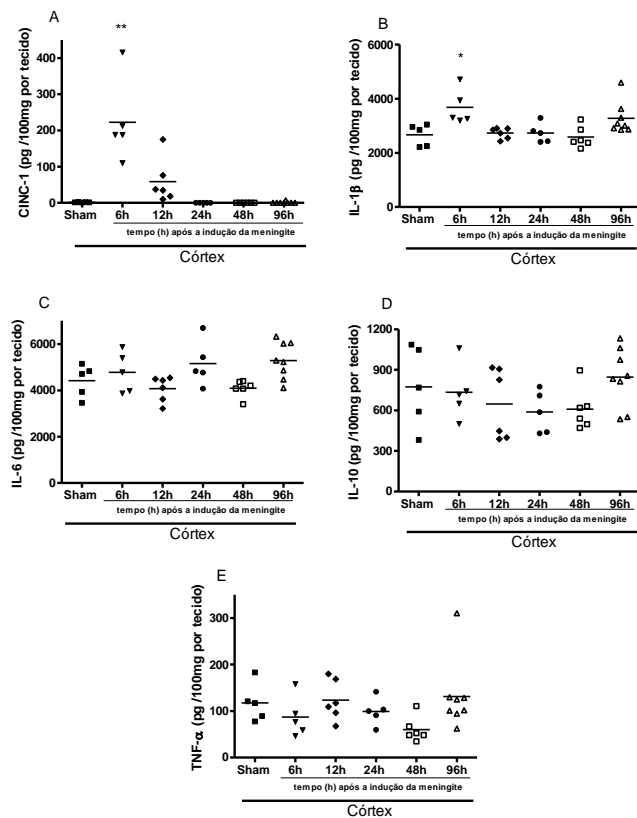
A figura 10 ilustra os efeitos da meningite ocasionada por *S. agalactiae* no hipocampo dos animais. Os níveis de CINC-1 (Fig.10A) foram aumentados em 6h ( $p<0,001$ ) e 12 h ( $p<0,05$ ). Os níveis de IL-1 $\beta$  (Fig.10B) aumentaram em 6, 12 e 24 h ( $p<0,05$ ) após a indução da meningite. Os níveis de IL-6 (Fig.11C) aumentaram em 6, 12 e 96 h ( $p<0,05$ ). Os níveis de IL-10 (Fig.10D) aumentaram em 24, 48 e 96 h ( $p<0,05$ ). Quando avaliado os níveis de TNF- $\alpha$  mostramos que houve um aumento em 24 h ( $p<0,05$ ) e 96 h ( $p<0,01$ ) após a indução da meningite.



**Figura 10:** Níveis de CINC-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  no hipocampo após a indução da meningite por *S. agalactiae*. As concentrações de CINC-1 (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C), IL-10 (D) e expressões de TNF- $\alpha$  (E) foram obtidos em diferentes tempos de 0, 6, 12, 24, 48 e 96 h de após a indução da meningite. Os resultados mostram a média  $\pm$  SEM de 5-6 animais em cada grupo. Símbolos indicam diferença estatística quando comparado com o grupo sham \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

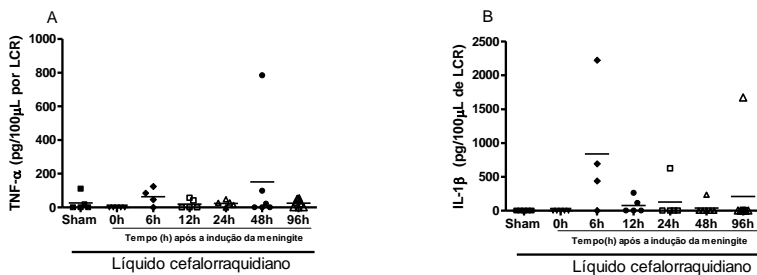


Quando avaliados os níveis de CINC-1 (Fig. 11A) e IL-1  $\beta$  (Fig. 11B) no córtex cerebral dos animais, observamos que houve um aumento significativo em seus níveis em 6 h ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente). Os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6, e IL-10 não tiveram alterações em seus níveis.



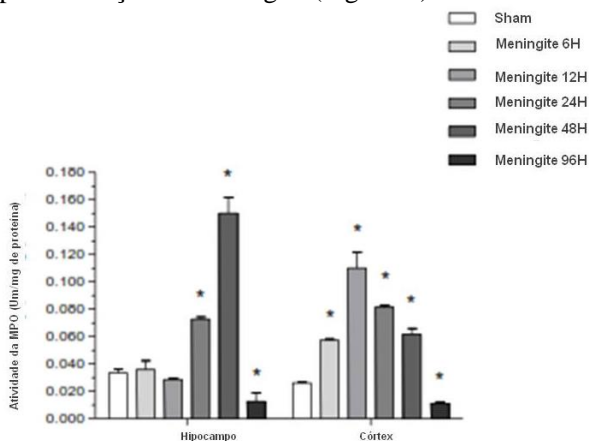
**Figura 11:** Níveis de CINC-1, IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  no córtex cerebral após a indução da meningite por *S. agalactiae*. As concentrações de CINC-1 (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C), IL-10 (D) e expressões de TNF- $\alpha$  (E) foram obtidos em diferentes tempos de 0, 6, 12, 24, 48 e 96 h de após a indução da meningite. Os resultados mostram a média  $\pm$  SEM de 5-6 animais em cada grupo. Símbolos indicam diferença estatística quando comparado com o grupo sham \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*

A figura 12 mostra os níveis de TNF- $\alpha$  (Fig. 12A) e IL-1 $\beta$  (Fig. 12B) no LCR, no entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.



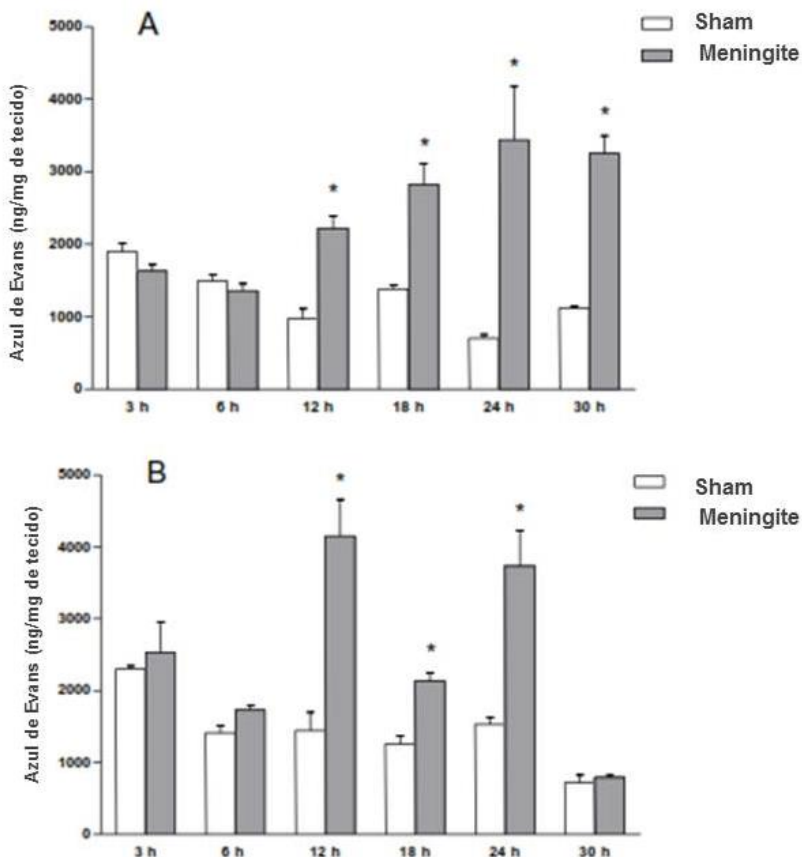
**Figura 12:** Níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no LCR após a indução da meningite por *S. agalactiae*. As concentrações de TNF- $\alpha$  (A) e IL-1 $\beta$  (B) foram obtidos em diferentes tempos de 0, 6, 12, 24, 48 e 96 horas após a indução da meningite. Os resultados mostram a média  $\pm$  SEM de 5-6 animais em cada grupo.

A atividade de MPO foi significativamente elevada em 24, 48 e 96 h no hipocampo (Fig. 13A) e em todos os tempos no córtex cerebral após a indução da meningite (Fig. 13B).



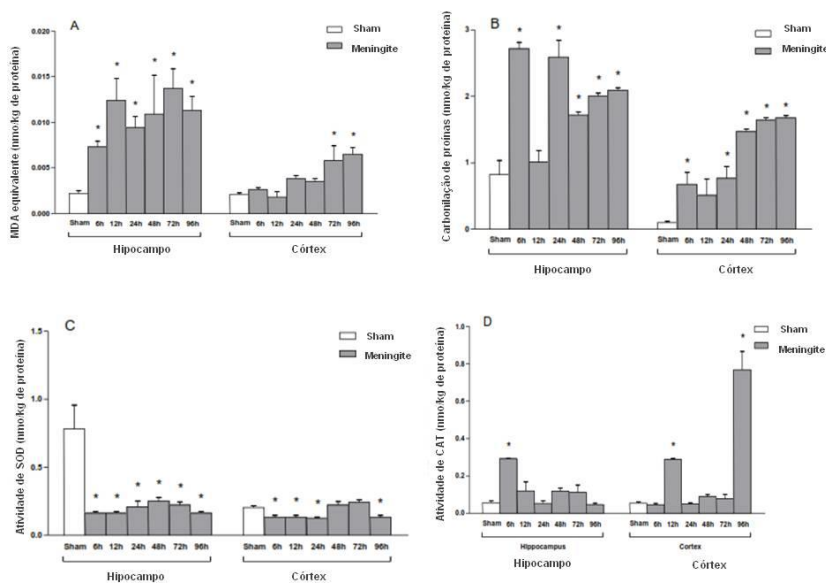
**Figura 13:** Atividade da mieloperoxidase no hipocampo e córtex cerebral após a indução da meningite por *S. agalactiae*. A atividade da MPO foi obtida em diferentes tempos de 6, 12, 24, 48 e 96 h após a indução da meningite. Os resultados mostram a média  $\pm$  SEM de 5-6 animais em cada grupo. Símbolos indicam diferença estatística quando comparado com o grupo sham \*  $p < 0,05$ .

A integridade da BHE em hipocampo (Fig. 14A) e córtex cerebral (Fig. 14B) foi investigada usando o corante azul de *Evans*. Observou-se sua ruptura entre 12 e 30 h ( $p < 0,05$ ) no hipocampo e entre 12 e 24 h ( $p < 0,05$ ) no córtex cerebral após a indução da meningite.



**Figura 14:** Avaliação da integridade da BHE foi investigada através do extravasamento do corante azul de *Evans* no hipocampo (A) e córtex (B) cerebral após a indução da meningite por *S. agalactiae*. As amostras foram obtidas em diferentes tempos de 3, 6, 12, 18, 24 e 30 h após a indução da meningite. Os resultados mostram a média  $\pm$  SEM de 5-6 animais em cada grupo. Símbolos indicam diferença estatística quando comparado com o grupo sham \*  $p < 0,05$ .

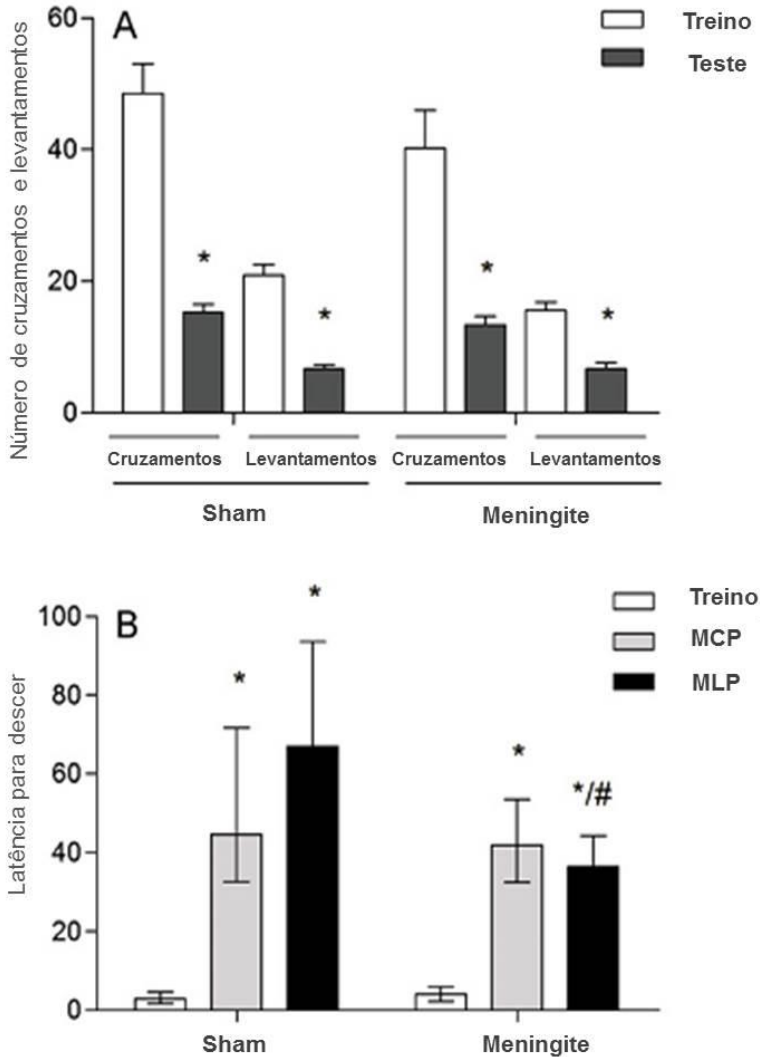
A figura 15 demonstra danos oxidativos e defesa enzimática no hipocampo e córtex cerebral em diferentes tempos após a indução da meningite. Níveis de TBARS mostraram-se aumentados no hipocampo em 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h ( $p < 0,05$ ) e no córtex cerebral de 72 e 96 h ( $p < 0,05$ ) após a indução da meningite (figura 15A). A carbonilação de proteínas foi aumentada no hipocampo e no córtex cerebral de 6, 24, 48, 72 e 96 h ( $p < 0,05$ ) (figura 15B). Encontramos uma diminuição da atividade da SOD no hipocampo em 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas ( $p < 0,05$ ) e no córtex cerebral de 6, 12, 24 e 96 h ( $p < 0,05$ ) após a indução da meningite (figura 15C). A atividade de CAT foi aumentada no hipocampo em 6 h ( $p < 0,05$ ) e no córtex cerebral de 12 e 96 h ( $p < 0,05$ ) após a indução da meningite, quando comparado com o grupo controle (Figura 15D).



**Figura 15:** Dano oxidativo e defesa enzimática no hipocampo e córtex após a indução da meningite por *S. agalactiae*. Os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (a), carbonilação de proteína (b), superóxido dismutase (SOD) (c) e catalase (CAT) (d) foram obtidos em diferentes tempos de 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a indução da meningite. Os resultados mostram a média  $\pm$  SEM de 5-6 animais em cada grupo. Símbolos indicam diferença estatística quando comparado com o grupo sham \*  $p < 0,05$ .

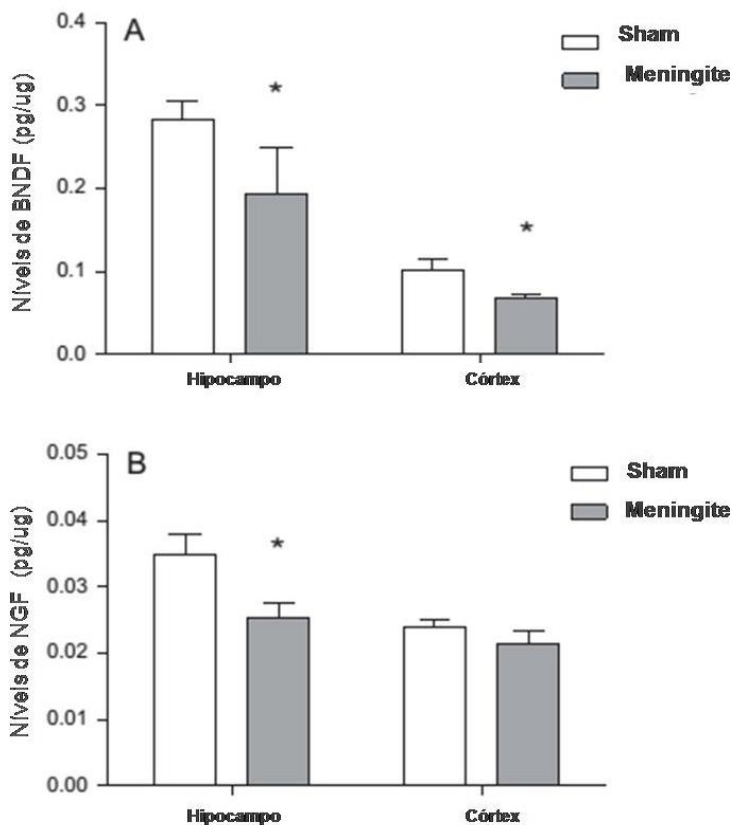
#### 4.5 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS

Sessenta dias após a indução da meningite, com os animais já na fase adulta, foram realizados os testes comportamentais. No teste de habituação ao campo aberto (Fig. 16A), não houve diferença no número de cruzamentos e levantamentos entre os grupos nas sessões treino e teste ( $p > 0,05$ ), demonstrando que não houve nenhuma diferença na atividade motora, exploratória e memória. No teste de esquiva inibitória (Fig. 16B), verificou-se que houve diferença entre as sessões treino e teste após um intervalo de 1,5 h (MCP) e 24 h (MLP). No entanto, quando avaliamos a memória de longo prazo em 24 horas após a sessão treino, verificamos que o grupo meningite teve uma diminuição na memória aversiva quando comparado ao grupo sham de longo prazo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 16:** Teste de habituação ao campo aberto (A) e esquia inibitória (B) em ratos Wistar adultos submetidos a meningite no período neonatal. Número de levantamentos e cruzamentos são expressos em média e desvio padrão entre as sessões treino e teste (10 por grupo). \*  $p < 0.05$  comparado com a sessão treino; #  $p < 0.05$  comparado com o grupo sham. MCP, memória de curto prazo/MLP, memória de longo prazo.

A expressão de BDNF e NGF são apresentados na figura 17A e 17B respectivamente. Os níveis de BDNF diminuíram no hipocampo e no córtex cerebral quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), no entanto os níveis de NGF diminuíram apenas no hipocampo quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).



**Figura 17:** Efeitos da meningite neonatal nos níveis de BDNF (A) e NGF (B) no hipocampo e córtex cerebral em ratos adultos. Os dados são reportados em média e desvio padrão. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle.

## 5 DISCUSSÃO

A meningite bacteriana está associada a uma alta taxa de morbidade e mortalidade, as razões para o desfecho clínico desfavorável incluem alterações vasculares cerebrais, quebra da BHE, formação de edema cerebral vasogênico e aumento da pressão intracraniana (Pfister et al., 1992). Os componentes bacterianos em conjunto com a resposta imune do hospedeiro desencadeiam uma cascata com a produção de citocinas, quimiocinas, ERO e ERN, as quais desempenham um papel crucial nos danos ocasionados pela meningite bacteriana no SNC (Weber et al., 2007).

Nós avaliamos a taxa de sobrevivência através da curva de Kaplan-Meier, que incluiu todos os animais desde o momento da infecção bacteriana. A partir das 48 h até o tempo de 96 h, 67,03 % dos animais morreram pela infecção, sendo que os que sobreviveram até esse tempo foram mortos posteriormente. Outros autores já estabeleceram que a meningite bacteriana alcança 100 % de mortalidade em 72 h na ausência de antibioticoterapia (Kim, 2010). Bekker e colaboradores (2014) relataram que a incidência de infecção invasiva pelo grupo B *Streptococcus* aumentou de 0.20 por mil nascidos vivos em 1987, para 0,32 mil por nascidos vivos em 2011 (Bekker et al., 2014). Apesar de haver um grande avanço no tratamento da meningite por *S. Agalactiae*, ainda existem altas taxas de mortalidade e morbidade, fazendo com que essa doença infecciosa esteja entre as mais preocupantes no mundo (Mook-Kanamori et al., 2011).

Nesse estudo demonstramos a influência do *S. agalactiae* na cinética de citocinas/quimiocinas, atividade da MPO e parâmetros de estresse oxidativo de duas regiões do cérebro, o hipocampo e o córtex cerebral de ratos neonatos. A invasão bacteriana no LCR estimula a bactéria a liberar componentes tais como cápsula de polissacarídeo, peptidoglicano, DNA bacteriano, e o ácido teicóico (Leib;Tauber, 1999), estimulando a ativação da defesa imune inata do cérebro, a liberação de uma cascata de mediadores inflamatórios e recrutamento dos leucócitos (Grandgirard;Leib, 2010). Mediadores inflamatórios, como quimiocinas CINC-1 e citocinas IL-1 $\alpha$  e IL-6, foram produzidos nas primeiras horas; IL-1 $\alpha$  permaneceu até 24 h e a IL-6 até 96 h no hipocampo. Porém, apenas CINC-1 e IL-1 $\alpha$  tiveram seus níveis aumentados no córtex cerebral. IL-1 $\alpha$  é normalmente encontrado no início da infecção em amostras do LCR de pacientes com meningite bacteriana, e a sua concentração é significativamente correlacionada



com parâmetros inflamatórios e resultados adversos da doença. Entretanto, IL-6 continua presente por períodos mais longos que as precedentes citocinas (Rusconi et al., 1991).

Baggiolini e colaboradores (1994) verificaram elevados níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8 na fase inicial da infecção no LCR antes do aumento de leucócitos. Então demonstrando que estas citocinas foram produzidas a partir de células normalmente presentes no SNC (Baggiolini et al., 1994), tais como células endoteliais, células da microglia, e astrócitos, o que indica que eles desempenham um importante papel na fase inicial da reação inflamatória local. Em nosso estudo os níveis de TNF- $\alpha$  apresentaram-se aumentados em 24 e 96 h no hipocampo, mas não no córtex cerebral de ratos neonatos após a infecção por *S. agalactiae*. Bogdan e colaboradores (1997) demonstraram em um estudo de modelo animal de meningite, que o TNF- $\alpha$  induziu perda neuronal no hipocampo, um efeito que foi antagonizado pela administração de anticorpos monoclonais anti-TNF- $\alpha$  (Bogdan et al., 1997).

A atividade da MPO manteve-se elevada até o quarto dia de infecção em ambas estruturas cerebrais. Edwards e colaboradores (1987) demonstraram que pacientes com meningites apresentaram um aumento da atividade de MPO em período prolongado, o que, provavelmente é resultado de uma intensa peroxidação de componentes sanguíneos, tais como albumina e lipoproteínas, o que pode contribuir para um sistêmico estresse oxidativo (Edwards et al., 1987). Como consequência da ativação, leucócitos polimorfonucleares gerariam quantidade considerável de espécies EROs e liberação de MPO (Zhang et al., 2002). A MPO liberada no espaço extracelular expressa efetiva atividade pró-oxidante. Miric e colaboradores (2010) demonstraram, no soro, que a atividade de MPO e peroxidação lipídica permaneceram elevadas em pacientes com meningite bacteriana ao longo do curso da doença (Miric et al., 2010).

Durante a última década, muitos estudos sobre ERO/ERN, mostraram sua ação nas alterações em modelo meningite bacteriana, e alguns deles parecem desempenhar um papel central no desenvolvimento de complicações associadas à meningite, podendo assim, ser associada a ativação imune, rompimento da BHE, insuficiência vascular e lesão neuronal (Klein et al., 2006a). Além disso o TNF- $\alpha$ , outras citocinas, quimiocinas, atividade MPO e estresse oxidativo podem estar envolvidos na quebra da BHE. Kim e colaboradores (1997) verificaram que a atividade de TNF- $\alpha$  no LCR estava relacionada com a passagem de albumina circulante através da

BHE, cerca de 18-24 h após a indução da meningite bacteriana intracisternal (Kim et al., 1997). Neste estudo verificamos que a ruptura da BHE iniciou em 12 h, no hipocampo e no córtex cerebral.

Segundo os resultados apresentados por Klein e colaboradores (2006), a inoculação intracisternal de TNF- $\alpha$  resultou em características de meningite bacteriana e ruptura da BHE em ratos (Rosenberg et al., 1995). Em estudo anterior com ratos recém-nascidos após meningite pneumocócica houve quebra da BHE nos mesmos tempos (Barichello;Lemos; et al., 2011). Durante todo o período do estudo nós encontramos um aumento no dano oxidativo em proteínas e na peroxidação lipídica, também verificamos um aumento do CINC-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, e TNF- $\alpha$  no hipocampo, e uma diminuição na atividade enzimática SOD, especialmente no hipocampo.

O dano oxidativo e as atividades enzimáticas de defesa também foram alterados durante todo período do estudo. No entanto, somente CINC-1 e IL-1  $\beta$  aumentaram no córtex cerebral em 6 h. Durante este período, houve carbonilação de proteínas, mas não houve peroxidação lipídica. O perfil de atividade da catalase também se mostrou alterado em ambas as áreas, aumentando em 6 h no hipocampo e no córtex cerebral em 12 e 96 h. A atividade de SOD diminuiu em quase todos os tempos no hipocampo, e em 6, 12, 24 e 96 h, no córtex cerebral. Em condições normais, a produção de espécies reativas é balanceada pelo sistema de defesa antioxidante no organismo.

Entretanto, quando a geração de espécies reativas excede a capacidade das defesas antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo (Droge, 2002). No entanto se o estresse oxidativo, não é muito intenso, ou de muito longa duração a atividade da SOD pode se apresentar aumentada, todavia se o estresse oxidativo persiste, ou seus níveis são muito elevados os danos às proteínas tornam-se significativos e a atividade de SOD pode se apresentar diminuída, quer seja através do dano oxidativo das moléculas de SOD, ou através de modificações na expressão de genes da SOD, ou ambos. Em nosso estudo a atividade de SOD estava diminuída.

No entanto, outras espécies reativas do oxigênio provavelmente são originadas nas células endoteliais e ativadas na microglia (Schaper et al., 2002). O processo inflamatório é intensificado por EROs provocando a adesão de leucócitos a células endoteliais, maior liberação de citocinas/quimiocinas inflamatórias e a produção de prostaglandinas (Klein et al., 2006a). Os astrócitos, células da glia, células endoteliais e macrófagos também podem produzir citocinas e outras moléculas pró-inflamatórias em resposta a estimulação (Hirst et

al., 2004). EROs são produzidas por bactérias que causam danos em células gliais por oxidação de lipídios de membrana e DNA levando à perda de integridade da membrana e depleção de energia, respectivamente (Koedel et al., 1999).

O cérebro é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo por causa do alto consumo energético, presença de ácidos graxos poli-insaturados e ferro não ligado às proteínas (Koracevic et al., 2001). Leib et al. (1996) verificaram que ROS contribuiu para lesão neuronal, necrose e apoptose em um modelo animal de meningite infantil por *S. agalactiae*. Além disso, o tratamento com o radical tert-butil-fenil-nitrona evitou danos neuronais (Leib et al., 1996). Atividade de óxido nítrico sintase também aumentou no cérebro durante a meningite por *S. agalactiae*, porém animais tratados com inibidor de iNOS apresentaram reduzida a produção de NO, mas aumentaram as convulsões, hiperperfusão e lesão neuronal cortical (Leib et al., 1996).

Os ratos pré-tratados com miméticos da SOD apresentaram diminuição na pressão intracraniana e diminuição no número de leucócitos no LCR. Entretanto, o tratamento com CAT não diminuiu estes parâmetros (Pfister et al., 1992). Acreditamos que, tal como demonstrado em outros órgãos (Ritter et al., 2004) e em estudo experimental com sepse (Barichello et al., 2006), um desequilíbrio entre a SOD e CAT pode ser responsável, em parte, pela ocorrência dos danos oxidativos nos cérebros de ratos.

Grandgirard e colaboradores (2007) verificaram um pico de apoptose entre 30 a 40 h após a infecção bacteriana. Durante este período, nosso estudo revelou um aumento na peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas, aumento da atividade da mieloperoxidase e das citocinas. No entanto houve uma diminuição de na atividade de SOD e nenhuma alteração na CAT (Grandgirard et al., 2007). Nesse estudo, foi observado o aumento da atividade de CAT.

Infecções neonatais bacterianas no SNC são graves, a interferência com a rede complexa de citocinas, quimiocinas, oxidantes e outros mediadores inflamatórios, podem ser responsáveis pela quebra da BHE e tendem a agravar a doença. Há ainda a necessidade de novas estratégias de tratamento adjuvante para meningite bacteriana (Tyler, 2008)

Em humanos e em modelo experimental animal, meningite bacteriana causa dano neuronal na região cortical e subcortical (Free et al., 1996). Duas diferentes formas de morte celular tem sido identificadas no giro dentado do hipocampo, uma importante região para o aprendizado e memória: morte celular clássica caspase-3-

dependente, isto é, apoptose e afeta principalmente a zona subgranular contendo neurônios imaturos, enquanto a morte celular caspase-3-independente, isto é, picrose, ocorre em toda a camada de células granulares dentada, afetando tanto neurônios maduros e imaturos (Bifare et al., 2003).

Déficit de aprendizagem e memória são sequelas neurológicas de longa duração encontradas em sobreviventes de meningite bacteriana. Na meningite pneumocócica experimental em ratos no período neonatal, a extensão da apoptose e da necrose nas áreas corticais e hipocámpais se correlacionaram com a extensão do déficit de aprendizagem (Leib et al., 2001).

Sobreviventes à meningite bacteriana sofrem com sequelas à memória e déficit de aprendizagem (Van De Beek et al., 2002). Barichello et al. (2010) demonstraram que ratos adultos sobreviventes a meningite por *S. pneumoniae* no período neonatal, apresentaram alterações na memória de habituação e na memória aversiva, esse déficit de memória foi correlacionado a diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo (Barichello; Belarmino; et al., 2010b). Dados de Grinwood et al (1995) e Bedford et al (2001) confirmaram também que cerca de 50% dos sobreviventes a meningite bacteriana apresentam dano cerebral e sequelas neurológicas (Bedford et al., 2001; Grimwood et al., 1995). Neste trabalho foi demonstrado a influência de meningite neonatal por *S. agalactiae* na vida adulta dos animais, comprovando que os animais apresentaram memória de habituação, no entanto, na avaliação da memória aversiva, verificou-se que os animais induzidos com meningite no período neonatal, apresentaram uma diminuição na memória de longa duração quando comparado com o grupo controle.

Os resultados do presente estudo mostram que os níveis de BDNF estavam reduzidos no hipocampo e no córtex cerebral. Esta neurotrofina é encontrada em vários tipos de células neuronais e é altamente expressa no hipocampo (Han et al., 2000), evidências indicam que o BDNF é essencial na manutenção de processos fisiológicos normais, e tem um papel importante na plasticidade sináptica e potenciação de longa duração (Kang, 1995). Desta maneira influencia a aprendizagem e a memória (Yamada et al., 2003). Além disso, Li e colaboradores (2007) demonstraram que BDNF poderia proteger um grande número de neurônios no córtex cerebral e hipocampo de lesão cerebral inflamatória na meningite bacteriana, um estudo anterior também mostrou que o BDNF bloqueou a ativação da caspase-3 em hipoxemia-isquemia neonatal (Li et al., 2007) (Han et al., 2000) e quando a ativação desta foi inibida houve uma diminuição das sequelas

neurológicas em animais induzidos com meningites por *S. agalactiae* (Irazuzta, 2008).

Em relação aos níveis de NGF houve diminuição somente no hipocampo, no entanto, o hipocampo não está exposto a bactérias ou infiltração de leucócitos diretamente, ele está cercado por líquido intersticial que é contígua com o LCR, permitindo que toxinas bacterianas secretadas e mediadores do sistema imune se difundam no parênquima (Rennels et al., 1985), ao contrário do córtex cerebral. O NGF foi a primeira neurotrofina descoberta por seu efeito estimulador sobre a diferenciação, sobrevivência e crescimento de neurônios no sistema nervoso periférico e central. Esta neurotrofina pode proteger axônios, mielina de danos inflamatórios e também pode modular o sistema imune, reduzindo a magnitude de excitotoxicidade durante a ativação inflamatória aguda (Colafrancesco et al., 2011).

Um estudo com crianças revelou que depois da recuperação da meningite bacteriana, significativos danos neurológicos e intelectuais ainda persistiram após dez anos (Grimwood et al., 2000). Esses achados sugerem que o modelo de meningite poderia ser um bom instrumento de pesquisa para o estudo dos mecanismos biológicos envolvidos nas alterações comportamentais resultantes de meningites por *S. agalactiae*.

Embora seja difícil extrapolar nossos resultados para a condição humana, a diminuição dos níveis de BDNF e NGF podem estar envolvidos na patogênese de meningite no período neonatal que persistem na vida adulta.

## 6 CONCLUSÃO

A meningite bacteriana por *S.agalactiae* é uma doença com alto índice de morbidade e mortalidade. Na fase inicial desta infecção devido à liberação de citocinas , quimiocinas e outros mediadores inflamatórios podem agravar a doença, com aumento da permeabilidade capilar, e comprometimento da BHE com rápida progressão da doença. Avanços na neuroimunobiologia celular estão levando a uma melhor compreensão das alterações decorrentes do processo inflamatório instalado na meningite bacteriana e das alterações que ocorrem no SNC .Uma melhor compreensão dos eventos celulares e moleculares envolvidos na patogênese da meningite bacteriana possibilitará o surgimento de novas abordagens que permitam diminuir os agravos decorrentes desta grave infecção. Neste estudo observamos que o hipocampo, apresentava altos índices de citocinas /quimiocinas nas fases iniciais desta infecção. A atividade da mieloperoxidase se apresentava elevada até o quarto dia da infecção em ambas as estruturas, hipocampo e córtex cerebral. Dano oxidativo e atividade de defesa enzimática estavam alterados em todas as fases deste estudo. Foi investigada ainda, a integridade da BHE e observamos que houve a quebra da BHE entre 12 h e 30 h no hipocampo, enquanto no córtex cerebral foi entre 12 h e 24 h.

Alem disso, os animais induzidos à meningite bacteriana por *S. agalactiae* no período neonatal apresentaram prejuízos na memória aversiva quando comparados com o grupo controle de memória de longa duração. Estes danos cognitivos foram relacionados com a diminuição de BDNF no hipocampo e córtex cerebral, enquanto o NGF apresentou diminuição somente no hipocampo, lesões nesta região afeta diretamente a memória. Estudos em modelo animal de meningite podem auxiliar no melhor entendimento das sequelas cognitivas e comportamentais a longo prazo, ocasionadas pela meningite no período neonatal. Pesquisas constantes são necessárias para aprofundar o conhecimento dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos na fisiopatologia desta doença e, além disso, novos estudos devem clarificar os efeitos neuroprotetores do BDNF e NGF como uma nova terapia no tratamento da meningite por *S. agalactiae*. Uma melhor compreensão dos eventos celulares e moleculares envolvidos na fisiopatologia da menngite possibilitará o surgimento de novas abordagens que permitam diminuir os danos decorrentes do intenso processo inflamatório instalado na fase inicial desta doença.

## REFERÊNCIAS

- Aebi, U.; Fowler, W. E.; Buhle, E. L., Jr.; Smith, P. R. Electron microscopy and image processing applied to the study of protein structure and protein-protein interactions. *J Ultrastruct Res*, v. 88, n. 2, p. 143-76, 1984.
- Alcamo, E.; Hacohen, N.; Schulte, L. C.; Rennert, P. D.; Hynes, R. O.; Baltimore, D. Requirement for the NF-kappaB family member RelA in the development of secondary lymphoid organs. *J Exp Med*, v. 195, n. 2, p. 233-44, 2002.
- Allan, S. M.; Rothwell, N. J. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, v. 2, n. 10, p. 734-44, 2001.
- Aloe, L.; Bracci-Laudiero, L.; Bonini, S.; Manni, L. The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases. *Allergy*, v. 52, n. 9, p. 883-94, 1997.
- Ancona, R. J.; Ferrieri, P.; Williams, P. P. Maternal factors that enhance the acquisition of group-B streptococci by newborn infants. *J Med Microbiol*, v. 13, n. 2, p. 273-80, 1980.
- Arancibia, S. A.; Beltran, C. J.; Aguirre, I. M.; Silva, P.; Peralta, A. L.; Malinarich, F.; Hermoso, M. A. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res*, v. 40, n. 2, p. 97-112, 2007.
- Armulik, A.; Abramsson, A.; Betsholtz, C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*, v. 97, n. 6, p. 512-23, 2005.
- Baggiolini, M.; Moser, B.; Clark-Lewis, I. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. The Giles Filley Lecture. *Chest*, v. 105, n. 3 Suppl, p. 95s-98s, 1994.

Balakumar, P.; Singh, M. Anti-tumour necrosis factor-alpha therapy in heart failure: future directions. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, v. 99, n. 6, p. 391-7, 2006.

Baltimore, R. S. Consequences of prophylaxis for group B streptococcal infections of the neonate. *Semin Perinatol*, v. 31, n. 1, p. 33-8, 2007.

Banks, W. A. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurol*, v. 9 Suppl 1, p. S3, 2009.

Bannister, J. V.; Calabrese, L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*, v. 32, p. 279-312, 1987.

Barichello, T.; Belarmino, E.; Comim, C. M.; Cipriano, A. L.; Generoso, J. S.; Savi, G. D.; Stertz, L.; Kapczinski, F.; Quevedo, J. Correlation between behavioral deficits and decreased brain-derived neurotrophic factor in neonatal meningitis. *J Neuroimmunol*, v. 223, n. 1-2, p. 73-76, 2010a.

Barichello, T.; Belarmino, E., Jr.; Comim, C. M.; Cipriano, A. L.; Generoso, J. S.; Savi, G. D.; Stertz, L.; Kapczinski, F.; Quevedo, J. Correlation between behavioral deficits and decreased brain-derived neurotrophic [correction of neurotrophic] factor in neonatal meningitis. *J Neuroimmunol*, v. 223, n. 1-2, p. 73-6, 2010b.

Barichello, T.; Dos Santos, I.; Savi, G. D.; Florentino, A. F.; Silvestre, C.; Comim, C. M.; Feier, G.; Sachs, D.; Teixeira, M. M.; Teixeira, A. L.; Quevedo, J. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) levels in the brain and cerebrospinal fluid after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*. *Neurosci Lett*, v. 467, n. 3, p. 217-9, 2009.

Barichello, T.; Fortunato, J. J.; Vitali, A. M.; Feier, G.; Reinke, A.; Moreira, J. C.; Quevedo, J.; Dal-Pizzol, F. Oxidative variables in the rat



brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med*, v. 34, n. 3, p. 886-9, 2006.

Barichello, T.; Lemos, J. C.; Generoso, J. S.; Carradore, M. M.; Moreira, A. P.; Collodel, A.; Zanatta, J. R.; Valvassori, S. S.; Quevedo, J. Evaluation of the brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor and memory in adult rats survivors of the neonatal meningitis by *Streptococcus agalactiae*. *Brain Res Bull*, 2012.

Barichello, T.; Lemos, J. C.; Generoso, J. S.; Cipriano, A. L.; Milioli, G. L.; Marcelino, D. M.; Vuolo, F.; Petronilho, F.; Dal-Pizzol, F.; Vilela, M. C.; Teixeira, A. L. Oxidative stress, cytokine/chemokine and disruption of blood-brain barrier in neonate rats after meningitis by *Streptococcus agalactiae*. *Neurochem Res*, v. 36, n. 10, p. 1922-30, 2011.

Barichello, T.; Pereira, J. S.; Savi, G. D.; Generoso, J. S.; Cipriano, A. L.; Silvestre, C.; Petronilho, F.; Dal-Pizzol, F.; Vilela, M. C.; Teixeira, A. L. A kinetic study of the cytokine/chemokines levels and disruption of blood-brain barrier in infant rats after pneumococcal meningitis. *J Neuroimmunol*, v. 233, n. 1-2, p. 12-7, 2011.

Barichello, T.; Savi, G. D.; Simoes, L. R.; Generoso, J. S.; Fraga, D. B.; Bellettini, G.; Daufenbach, J. F.; Rezin, G. T.; Scaini, G.; Streck, E. L. Evaluation of mitochondrial respiratory chain in the brain of rats after pneumococcal meningitis. *Brain Res Bull*, v. 82, n. 5-6, p. 302-7, 2010.

Bauer, H.; Zweimueller-Mayer, J.; Steinbacher, P.; Lametschwandtner, A.; Bauer, H. C. The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. *J Biomed Biotechnol*, v. 2010, p. 402593, 2010.

Bauer, K.; Zemlin, M.; Hummel, M.; Pfeiffer, S.; Karstaedt, J.; Steinhäuser, G.; Xiao, X.; Versmold, H.; Berek, C. Diversification of Ig heavy chain genes in human preterm neonates prematurely exposed to environmental antigens. *J Immunol*, v. 169, n. 3, p. 1349-56, 2002.

Bazzoni, G.; Dejana, E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*, v. 84, n. 3, p. 869-901, 2004.

Bedford, H.; De Louvois, J.; Halket, S.; Peckham, C.; Hurley, R.; Harvey, D. Meningitis in infancy in England and Wales: follow up at age 5 years. *BMJ*, v. 323, n. 7312, p. 533-6, 2001.

Bekker, V.; Bijlsma, M. W.; Van De Beek, D.; Kuijpers, T. W.; Van Der Ende, A. Incidence of invasive group B streptococcal disease and pathogen genotype distribution in newborn babies in the Netherlands over 25 years: a nationwide surveillance study. *Lancet Infect Dis*, v. 14, n. 11, p. 1083-9, 2014.

Bevilaqua, L. R.; Kerr, D. S.; Medina, J. H.; Izquierdo, I.; Cammarota, M. Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci*, v. 17, n. 4, p. 897-902, 2003.

Bhardwaj, A.; Aggarwal, B. B. Receptor-mediated choreography of life and death. *J Clin Immunol*, v. 23, n. 5, p. 317-32, 2003.

Bifrare, Y. D.; Gianinazzi, C.; Imboden, H.; Leib, S. L.; Tauber, M. G. Bacterial meningitis causes two distinct forms of cellular damage in the hippocampal dentate gyrus in infant rats. *Hippocampus*, v. 13, n. 4, p. 481-8, 2003.

Bifrare, Y. D.; Kummer, J.; Joss, P.; Tauber, M. G.; Leib, S. L. Brain-derived neurotrophic factor protects against multiple forms of brain injury in bacterial meningitis. *J Infect Dis*, v. 191, n. 1, p. 40-5, 2005.

Bloch, A.; Thoenen, H. Characterization of nerve growth factor (NGF) release from hippocampal neurons: evidence for a constitutive and an

unconventional sodium-dependent regulated pathway. *Eur J Neurosci*, v. 7, n. 6, p. 1220-8, 1995.

Bogdan, I.; Leib, S. L.; Bergeron, M.; Chow, L.; Tauber, M. G. Tumor necrosis factor-alpha contributes to apoptosis in hippocampal neurons during experimental group B streptococcal meningitis. *J Infect Dis*, v. 176, n. 3, p. 693-7, 1997.

Brietzke, E.; Kapczinski, F. TNF-alpha as a molecular target in bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 32, n. 6, p. 1355-61, 2008.

Capsoni, S.; Tiveron, C.; Amato, G.; Vignone, D.; Cattaneo, A. Peripheral neutralization of nerve growth factor induces immunosympathectomy and central neurodegeneration in transgenic mice. *J Alzheimers Dis*, v. 20, n. 2, p. 527-46, 2010.

Colafrancesco, V.; Villoslada, P. Targeting NGF pathway for developing neuroprotective therapies for multiple sclerosis and other neurological diseases. *Arch Ital Biol*, v. 149, n. 2, p. 183-92, 2011.

Cornelis, P.; Wei, Q.; Andrews, S. C.; Vinckx, T. Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics*, v. 3, n. 6, p. 540-9, 2011.

Correale, J.; Villa, A. Cellular elements of the blood-brain barrier. *Neurochem Res*, v. 34, n. 12, p. 2067-77, 2009.

Daneman, R.; Zhou, L.; Kebede, A. A.; Barres, B. A. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*, v. 468, n. 7323, p. 562-6, 2010.

De Gans, J.; Van De Beek, D. Dexamethasone in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med*, v. 347, n. 20, p. 1549-56, 2002.

Della, F. P.; Abelaira, H. M.; Reus, G. Z.; Santos, M. A.; Tomaz, D. B.; Antunes, A. R.; Scaini, G.; Morais, M. O.; Streck, E. L.; Quevedo, J. Treatment with tianeptine induces antidepressive-like effects and alters the neurotrophin levels, mitochondrial respiratory chain and cycle Krebs enzymes in the brain of maternally deprived adult rats. *Metab Brain Dis*, v. 28, n. 1, p. 93-105, 2013.

Dmitrzak-Weglarz, M.; Rybakowski, J. K.; Suwalska, A.; Skibinska, M.; Leszczynska-Rodziewicz, A.; Szczepankiewicz, A.; Hauser, J. Association studies of the BDNF and the NTRK2 gene polymorphisms with prophylactic lithium response in bipolar patients. *Pharmacogenomics*, v. 9, n. 11, p. 1595-603, 2008.

Draper, H. H.; Hadley, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, v. 186, p. 421-31, 1990.

Dutra, V. G.; Alves, V. M.; Olendzki, A. N.; Dias, C. A.; De Bastos, A. F.; Santos, G. O.; De Amorim, E. L.; Sousa, M. A.; Santos, R.; Ribeiro, P. C.; Fontes, C. F.; Andrey, M.; Magalhaes, K.; Araujo, A. A.; Paffadore, L. F.; Marconi, C.; Murta, E. F.; Fernandes, P. C., Jr.; Raddi, M. S.; Marinho, P. S.; Bornia, R. B.; Palmeiro, J. K.; Dalla-Costa, L. M.; Pinto, T. C.; Botelho, A. C.; Teixeira, L. M.; Fracalanza, S. E. *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. *BMC Infect Dis*, v. 14, p. 323, 2014.

Edwards, S. W.; Nurcombe, H. L.; Hart, C. A. Oxidative inactivation of myeloperoxidase released from human neutrophils. *Biochem J*, v. 245, n. 3, p. 925-8, 1987.

El Bashir, H.; Laundry, M.; Booy, R. Diagnosis and treatment of bacterial meningitis. *Arch Dis Child*, v. 88, n. 7, p. 615-20, 2003.

Findley, M. K.; Koval, M. Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB Life*, v. 61, n. 4, p. 431-7, 2009.

Free, S. L.; Li, L. M.; Fish, D. R.; Shorvon, S. D.; Stevens, J. M. Bilateral hippocampal volume loss in patients with a history of encephalitis or meningitis. *Epilepsia*, v. 37, n. 4, p. 400-5, 1996.

Freidin, M.; Bennett, M. V.; Kessler, J. A. Cultured sympathetic neurons synthesize and release the cytokine interleukin 1 beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 89, n. 21, p. 10440-3, 1992.

Frey, B. N.; Andreazza, A. C.; Cereser, K. M.; Martins, M. R.; Valvassori, S. S.; Reus, G. Z.; Quevedo, J.; Kapczinski, F. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci*, v. 79, n. 3, p. 281-6, 2006.

Gerber, J.; Nau, R. Mechanisms of injury in bacterial meningitis. *Curr Opin Neurol*, v. 23, n. 3, p. 312-8, 2010.

Ghosh, A.; Carnahan, J.; Greenberg, M. E. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science*, v. 263, n. 5153, p. 1618-23, 1994.

Giaume, C.; Koulakoff, A.; Roux, L.; Holcman, D.; Rouach, N. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci*, v. 11, n. 2, p. 87-99, 2010.

Gosselin, D.; Rivest, S. Role of IL-1 and TNF in the brain: twenty years of progress on a Dr. Jekyll/Mr. Hyde duality of the innate immune system. *Brain Behav Immun*, v. 21, n. 3, p. 281-9, 2007.

Grandgirard, D.; Leib, S. L. Meningitis in neonates: bench to bedside. *Clin Perinatol*, v. 37, n. 3, p. 655-76, 2010.

Grandgirard, D.; Oberson, K.; Buhlmann, A.; Gaumann, R.; Leib, S. L. Attenuation of cerebrospinal fluid inflammation by the nonbacteriolytic

antibiotic daptomycin versus that by ceftriaxone in experimental pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 54, n. 3, p. 1323-6, 2010.

Grandgirard, D.; Steiner, O.; Tauber, M. G.; Leib, S. L. An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol*, v. 114, n. 6, p. 609-17, 2007.

Grimwood, K.; Anderson, P.; Anderson, V.; Tan, L.; Nolan, T. Twelve year outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects. *Arch Dis Child*, v. 83, n. 2, p. 111-6, 2000.

Grimwood, K.; Anderson, V. A.; Bond, L.; Catroppa, C.; Hore, R. L.; Keir, E. H.; Nolan, T.; Roberton, D. M. Adverse outcomes of bacterial meningitis in school-age survivors. *Pediatrics*, v. 95, n. 5, p. 646-56, 1995.

Halliwell, B.; Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*, v. 142, n. 2, p. 231-55, 2004.

Han, B. H.; Holtzman, D. M. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci*, v. 20, n. 15, p. 5775-81, 2000.

Harrison, L. H.; Elliott, J. A.; Dwyer, D. M.; Libonati, J. P.; Ferrieri, P.; Billmann, L.; Schuchat, A. Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: implications for vaccine formulation. Maryland Emerging Infections Program. *J Infect Dis*, v. 177, n. 4, p. 998-1002, 1998.

Hickman, M. E.; Rench, M. A.; Ferrieri, P.; Baker, C. J. Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. *Pediatrics*, v. 104, n. 2 Pt 1, p. 203-9, 1999.

Hirst, R. A.; Kadioglu, A.; O'callaghan, C.; Andrew, P. W. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin Exp Immunol*, v. 138, n. 2, p. 195-201, 2004.

Hohsfield, L. A.; Geley, S.; Reindl, M.; Humpel, C. The generation of NGF-secreting primary rat monocytes: a comparison of different transfer methods. *J Immunol Methods*, v. 391, n. 1-2, p. 112-24, 2013.

Honda, H.; Warren, D. K. Central nervous system infections: meningitis and brain abscess. *Infect Dis Clin North Am*, v. 23, n. 3, p. 609-23, 2009.

Hopkins, S. J. The pathophysiological role of cytokines. *Leg Med (Tokyo)*, v. 5 Suppl 1, p. S45-57, 2003.

Irazuzta, J. E.; Pretzlaff, R. K.; Zingarelli, B.; Xue, V.; Zemlan, F. Modulation of nuclear factor-kappaB activation and decreased markers of neurological injury associated with hypothermic therapy in experimental bacterial meningitis. *Crit Care Med*, v. 30, n. 11, p. 2553-9, 2002.

Izquierdo, I.; Barros, D. M.; Mello E Souza, T.; De Souza, M. M.; Izquierdo, L. A.; Medina, J. H. Mechanisms for memory types differ. *Nature*, v. 393, n. 6686, p. 635-6, 1998.

Janeway, C.; Travers, P.; Hunt, S. V.; Walport, M. *Immunobiology : the immune system in health and disease*. 3rd. London

Jarrard, L. E.; Elmes, D. G. Role of retroactive interference in the spatial memory of normal rats and rats with hippocampal lesions. *J Comp Physiol Psychol*, v. 96, n. 5, p. 699-711, 1982.

Jiang, S. M.; Cieslewicz, M. J.; Kasper, D. L.; Wessels, M. R. Regulation of virulence by a two-component system in group B streptococcus. *J Bacteriol*, v. 187, n. 3, p. 1105-13, 2005.

Johri, A. K.; Lata, H.; Yadav, P.; Dua, M.; Yang, Y.; Xu, X.; Homma, A.; Barocchi, M. A.; Bottomley, M. J.; Saul, A.; Klugman, K. P.; Black, S. Epidemiology of Group B Streptococcus in developing countries. *Vaccine*, v. 31 Suppl 4, p. D43-5, 2013.

Kastenbauer, S.; Koedel, U.; Becker, B. F.; Pfister, H. W. Oxidative stress in bacterial meningitis in humans. *Neurology*, v. 58, n. 2, p. 186-91, 2002.

Kato-Semba, R.; Wakako, R.; Komori, T.; Shigemi, H.; Miyazaki, N.; Ito, H.; Kumagai, T.; Tsuzuki, M.; Shigemi, K.; Yoshida, F.; Nakayama, A. Age-related changes in BDNF protein levels in human serum: differences between autism cases and normal controls. *Int J Dev Neurosci*, v. 25, n. 6, p. 367-72, 2007.

Kawai, T.; Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, v. 11, n. 5, p. 373-84, 2010.

Kim, I. Y.; Stadtman, T. C. Inhibition of NF-kappaB DNA binding and nitric oxide induction in human T cells and lung adenocarcinoma cells by selenite treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, n. 24, p. 12904-7, 1997.

Kim, K. S. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nat Rev Microbiol*, v. 6, n. 8, p. 625-34, 2008.

Kim, K. S. Acute bacterial meningitis in infants and children. *Lancet Infect Dis*, v. 10, n. 1, p. 32-42, 2010.



Klein, M.; Koedel, U.; Pfister, H.-W. Oxidative stress in pneumococcal meningitis: A future target for adjunctive therapy? *Prog Neurobiol*, v. 80, n. 6, p. 269-280, 2006a.

Klein, M.; Koedel, U.; Pfister, H. W. Oxidative stress in pneumococcal meningitis: a future target for adjunctive therapy? *Prog Neurobiol*, v. 80, n. 6, p. 269-80, 2006b.

Koedel, U.; Pfister, H. W. Oxidative stress in bacterial meningitis. *Brain Pathol*, v. 9, n. 1, p. 57-67, 1999.

Kontos, C. D.; Wei, E. P.; Williams, J. I.; Kontos, H. A.; Povlishock, J. T. Cytochemical detection of superoxide in cerebral inflammation and ischemia in vivo. *Am J Physiol*, v. 263, n. 4 Pt 2, p. H1234-42, 1992.

Koracevic, D.; Koracevic, G.; Djordjevic, V.; Andrejevic, S.; Cosic, V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol*, v. 54, n. 5, p. 356-61, 2001.

Kurino, M.; Fukunaga, K.; Ushio, Y.; Miyamoto, E. Activation of mitogen-activated protein kinase in cultured rat hippocampal neurons by stimulation of glutamate receptors. *J Neurochem*, v. 65, n. 3, p. 1282-9, 1995.

Kuruvilla, K. A.; Thomas, N.; Jesudasan, M. V.; Jana, A. K. Neonatal Group B Streptococcal bacteraemia in India: ten years' experience. *Acta Paediatr*, v. 88, n. 9, p. 1031-2, 1999.

Lachenauer, C. S.; Kasper, D. L.; Shimada, J.; Ichiman, Y.; Ohtsuka, H.; Kaku, M.; Paoletti, L. C.; Ferrieri, P.; Madoff, L. C. Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. *J Infect Dis*, v. 179, n. 4, p. 1030-3, 1999.

Laving, A. M.; Musoke, R. N.; Wasunna, A. O.; Revathi, G. Neonatal bacterial meningitis at the newborn unit of Kenyatta National Hospital. *East Afr Med J*, v. 80, n. 9, p. 456-62, 2003.

Leib, S. L.; Clements, J. M.; Lindberg, R. L.; Heimgartner, C.; Loeffler, J. M.; Pfister, L. A.; Tauber, M. G.; Leppert, D. Inhibition of matrix metalloproteinases and tumour necrosis factor alpha converting enzyme as adjuvant therapy in pneumococcal meningitis. *Brain*, v. 124, n. Pt 9, p. 1734-42, 2001.

Leib, S. L.; Kim, Y. S.; Chow, L. L.; Sheldon, R. A.; Tauber, M. G. Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. *J Clin Invest*, v. 98, n. 11, p. 2632-9, 1996.

Leib, S. L.; Tauber, M. G. Pathogenesis of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am*, v. 13, n. 3, p. 527-48, v-vi, 1999.

Leib, S. L.; Täuber, M. G. PATHOGENESIS OF BACTERIAL MENINGITIS. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 13, n. 3, p. 527-548, 1999.

Lembo, A.; Gurney, M. A.; Burnside, K.; Banerjee, A.; De Los Reyes, M.; Connelly, J. E.; Lin, W. J.; Jewell, K. A.; Vo, A.; Renken, C. W.; Doran, K. S.; Rajagopal, L. Regulation of CovR expression in Group B Streptococcus impacts blood-brain barrier penetration. *Mol Microbiol*, v. 77, n. 2, p. 431-43, 2010.

Levine, R. L.; Garland, D.; Oliver, C. N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A. G.; Ahn, B. W.; Shaltiel, S.; Stadtman, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, v. 186, p. 464-78, 1990.

Li, L.; Shui, Q. X.; Liang, K.; Ren, H. Brain-derived neurotrophic factor rescues neurons from bacterial meningitis. *Pediatr Neurol*, v. 36, n. 5, p. 324-9, 2007.

Liakopoulos, A.; Mavroidi, A.; Vourli, S.; Panopoulou, M.; Zachariadou, L.; Chatzipanagiotou, S.; Spiliopoulou, I.; Zerva, L.; Petinaki, E. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* from vaginal colonization and neonatal infections: a 4-year multicenter study in Greece. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 78, n. 4, p. 487-490, 2014.

Lindahl, G.; Stalhammar-Carlemalm, M.; Areschoug, T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clin Microbiol Rev*, v. 18, n. 1, p. 102-27, 2005.

Lindholm, D.; Carroll, P.; Tzimagiogis, G.; Thoenen, H. Autocrine-paracrine regulation of hippocampal neuron survival by IGF-1 and the neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4. *Eur J Neurosci*, v. 8, n. 7, p. 1452-60, 1996.

Lissi, E.; Salim-Hanna, M.; Pascual, C.; Del Castillo, M. D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med*, v. 18, n. 2, p. 153-8, 1995.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

Mace, S. E. Acute bacterial meningitis. *Emerg Med Clin North Am*, v. 26, n. 2, p. 281-317, viii, 2008.

Machado-Vieira, R.; Manji, H. K.; Zarate, C. A., Jr. The role of lithium in the treatment of bipolar disorder: convergent evidence for

neurotrophic effects as a unifying hypothesis. *Bipolar Disord*, v. 11 Suppl 2, p. 92-109, 2009.

Madduri, S.; Papaloizos, M.; Gander, B. Synergistic effect of GDNF and NGF on axonal branching and elongation in vitro. *Neurosci Res*, v. 65, n. 1, p. 88-97, 2009.

Madhi, S. A.; Radebe, K.; Crewe-Brown, H.; Frasch, C. E.; Arakere, G.; Mokhachane, M.; Kimura, A. High burden of invasive *Streptococcus agalactiae* disease in South African infants. *Ann Trop Paediatr*, v. 23, n. 1, p. 15-23, 2003.

Marini, A. M.; Jiang, X.; Wu, X.; Pan, H.; Guo, Z.; Mattson, M. P.; Blondeau, N.; Novelli, A.; Lipsky, R. H. Preconditioning and neurotrophins: a model for brain adaptation to seizures, ischemia and other stressful stimuli. *Amino Acids*, v. 32, n. 3, p. 299-304, 2007.

Melin, P. Neonatal group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies. *Clin Microbiol Infect*, v. 17, n. 9, p. 1294-303, 2011.

Melville, J. M.; Moss, T. J. The immune consequences of preterm birth. *Front Neurosci*, v. 7, p. 79, 2013.

Menezes, A. P. D. O.; Campos, L. C.; Dos Santos, M. S.; Azevedo, J.; Dos Santos, R. C. N.; Carvalho, M. D. G. S.; Beall, B. W.; Martin, S. W.; Salgado, K.; Reis, M. G.; Ko, A. I.; Reis, J. N. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000–2007. *Vaccine*, v. 29, n. 6, p. 1139-1144, 2011.

Miric, D.; Katanic, R.; Kisic, B.; Zoric, L.; Miric, B.; Mitic, R.; Dragojevic, I. Oxidative stress and myeloperoxidase activity during bacterial meningitis: effects of febrile episodes and the BBB permeability. *Clin Biochem*, v. 43, n. 3, p. 246-52, 2010.

Moller, K.; Tofteng, F.; Qvist, T.; Sahl, C.; Sonderkaer, S.; Pedersen, B. K. Cerebral output of cytokines in patients with pneumococcal meningitis. *Crit Care Med*, v. 33, n. 5, p. 979-83, 2005.

Mook-Kanamori, B. B.; Geldhoff, M.; Van Der Poll, T.; Van De Beek, D. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin Microbiol Rev*, v. 24, n. 3, p. 557-91, 2011.

Moore, M. R.; Schrag, S. J.; Schuchat, A. Effects of intrapartum antimicrobial prophylaxis for prevention of group-B-streptococcal disease on the incidence and ecology of early-onset neonatal sepsis. *Lancet Infect Dis*, v. 3, n. 4, p. 201-13, 2003.

Nabel, G.; Baltimore, D. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature*, v. 326, n. 6114, p. 711-3, 1987.

Nassenstein, C.; Braun, A.; Erpenbeck, V. J.; Lommatzsch, M.; Schmidt, S.; Krug, N.; Luttmann, W.; Renz, H.; Virchow, J. C., Jr. The neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 are survival and activation factors for eosinophils in patients with allergic bronchial asthma. *J Exp Med*, v. 198, n. 3, p. 455-67, 2003.

Nau, R.; Eiffert, H. Modulation of release of proinflammatory bacterial compounds by antibacterials: potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitis. *Clin Microbiol Rev*, v. 15, n. 1, p. 95-110, 2002.

Nizet, V.; Gibson, R. L.; Chi, E. Y.; Framson, P. E.; Hulse, M.; Rubens, C. E. Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. *Infect Immun*, v. 64, n. 9, p. 3818-26, 1996.

Pattabiraman, P. P.; Tropea, D.; Chiaruttini, C.; Tongiorgi, E.; Cattaneo, A.; Domenici, L. Neuronal activity regulates the developmental expression and subcellular localization of cortical BDNF mRNA isoforms in vivo. *Mol Cell Neurosci*, v. 28, n. 3, p. 556-70, 2005.

Pfister, H. W.; Borasio, G. D.; Dirnagl, U.; Bauer, M.; Einhaupl, K. M. Cerebrovascular complications of bacterial meningitis in adults. *Neurology*, v. 42, n. 8, p. 1497-504, 1992.

Phares, C. R.; Lynfield, R.; Farley, M. M.; Mohle-Boetani, J.; Harrison, L. H.; Petit, S.; Craig, A. S.; Schaffner, W.; Zansky, S. M.; Gershman, K.; Stefonek, K. R.; Albanese, B. A.; Zell, E. R.; Schuchat, A.; Schrag, S. J. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA*, v. 299, n. 17, p. 2056-65, 2008.

Pieczenik, S. R.; Neustadt, J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol*, v. 83, n. 1, p. 84-92, 2007.

Post, R. M. Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications. *J Psychiatr Res*, v. 41, n. 12, p. 979-90, 2007.

Putz, K.; Hayani, K.; Zar, F. A. Meningitis. Primary Care: Clinics in Office Practice, v. 40, n. 3, p. 707-726, 2013.

Putz, R.; Sobotta, J.; Pabst, R.; Putz, R. Atlas de anatomía humana. Editorial Médica Panamericana, 2006. ISBN 9788479036331. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=La28emq-DCsC> >.

Quevedo, J.; Vianna, M. R.; Roesler, R.; De-Paris, F.; Izquierdo, I.; Rose, S. P. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem*, v. 6, n. 6, p. 600-7, 1999.

Rennels, M. L.; Gregory, T. F.; Blaumanis, O. R.; Fujimoto, K.; Grady, P. A. Evidence for a 'paravascular' fluid circulation in the mammalian central nervous system, provided by the rapid distribution of tracer protein throughout the brain from the subarachnoid space. *Brain Res*, v. 326, n. 1, p. 47-63, 1985.

Ritter, C.; Reinke, A.; Andrades, M.; Martins, M. R.; Rocha, J.; Menna-Barreto, S.; Quevedo, J.; Moreira, J. C.; Dal-Pizzol, F. Protective effect of N-acetylcysteine and deferoxamine on carbon tetrachloride-induced acute hepatic failure in rats. *Crit Care Med*, v. 32, n. 10, p. 2079-83, 2004.

Roesler, R.; Lessa, D.; Venturella, R.; Vianna, M. R.; Luft, T.; Henriques, J. A.; Izquierdo, I.; Schwartsmann, G. Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. *Eur J Neurosci*, v. 19, n. 4, p. 1041-5, 2004.

Roesler, R.; Schroder, N.; Vianna, M. R.; Quevedo, J.; Bromberg, E.; Kapczinski, F.; Ferreira, M. B. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Res*, v. 975, n. 1-2, p. 207-13, 2003.

Rosenberg, G. A.; Estrada, E. Y.; Dencoff, J. E.; Stetler-Stevenson, W. G. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced gelatinase B causes delayed opening of the blood-brain barrier: an expanded therapeutic window. *Brain Res*, v. 703, n. 1-2, p. 151-5, 1995.

Rusconi, F.; Parizzi, F.; Garlaschi, L.; Assael, B. M.; Sironi, M.; Ghezzi, P.; Mantovani, A. Interleukin 6 activity in infants and children with bacterial meningitis. The Collaborative Study on Meningitis. *Pediatr Infect Dis J*, v. 10, n. 2, p. 117-21, 1991.

Saha, R. N.; Liu, X.; Pahan, K. Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: a case for the neuroprotective role of cytokine. *J Neuroimmune Pharmacol*, v. 1, n. 3, p. 212-22, 2006.

Schaper, M.; Gergely, S.; Lykkesfeldt, J.; Zbaren, J.; Leib, S. L.; Tauber, M. G.; Christen, S. Cerebral vasculature is the major target of oxidative protein alterations in bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol*, v. 61, n. 7, p. 605-13, 2002.

Schrag, S. J.; Zywicki, S.; Farley, M. M.; Reingold, A. L.; Harrison, L. H.; Lefkowitz, L. B.; Hadler, J. L.; Danila, R.; Cieslak, P. R.; Schuchat, A. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med*, v. 342, n. 1, p. 15-20, 2000.

Schuchat, A. Group B streptococcus. *Lancet*, v. 353, n. 9146, p. 51-6, 1999.

Schuchat, A. Group B streptococcal disease: from trials and tribulations to triumph and trepidation. *Clin Infect Dis*, v. 33, n. 6, p. 751-6, 2001.

Schuchat, A.; Dowell, S. F. Pneumonia in children in the developing world: new challenges, new solutions. *Semin Pediatr Infect Dis*, v. 15, n. 3, p. 181-9, 2004.

Scott, M. D.; Lubin, B. H.; Zuo, L.; Kuypers, F. A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *J Lab Clin Med*, v. 118, n. 1, p. 7-16, 1991.

Segal, R. A.; Greenberg, M. E. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci*, v. 19, p. 463-89, 1996.

Sellner, J.; Tauber, M. G.; Leib, S. L. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial CNS infections. *Handb Clin Neurol*, v. 96, p. 1-16, 2010.



Shimizu, E.; Hashimoto, K.; Okamura, N.; Koike, K.; Komatsu, N.; Kumakiri, C.; Nakazato, M.; Watanabe, H.; Shinoda, N.; Okada, S.; Iyo, M. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry*, v. 54, n. 1, p. 70-5, 2003.

Slotved, H. C.; Kong, F.; Lambertsen, L.; Sauer, S.; Gilbert, G. L. Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. *J Clin Microbiol*, v. 45, n. 9, p. 2929-36, 2007.

Sofroniew, M. V.; Howe, C. L.; Mobley, W. C. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci*, v. 24, p. 1217-81, 2001.

Stamatovic, S. M.; Keep, R. F.; Andjelkovic, A. V. Brain endothelial cell-cell junctions: how to "open" the blood brain barrier. *Curr Neuroparmacol*, v. 6, n. 3, p. 179-92, 2008.

Stevens, D. L.; Kaplan, E. L. *Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis*. Oxford University Press, 2000.

Tenenbaum, T.; Spellerberg, B.; Adam, R.; Vogel, M.; Kim, K. S.; Schrotten, H. *Streptococcus agalactiae* invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb. *Microbes Infect*, v. 9, n. 6, p. 714-20, 2007.

Thanabalasundaram, G.; Pieper, C.; Lischper, M.; Galla, H. J. Regulation of the blood-brain barrier integrity by pericytes via matrix metalloproteinases mediated activation of vascular endothelial growth factor in vitro. *Brain Res*, v. 1347, p. 1-10, 2010.

Thomas, G. M.; Huganir, R. L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, v. 5, n. 3, p. 173-83, 2004.

Thomas, K. E.; Hasbun, R.; Jekel, J.; Quagliarello, V. J. The diagnostic accuracy of Kernig's sign, Brudzinski's sign, and nuchal rigidity in adults with suspected meningitis. *Clin Infect Dis*, v. 35, n. 1, p. 46-52, 2002.

Trampuz, A.; Steinhuber, A.; Wittwer, M.; Leib, S. L. Rapid diagnosis of experimental meningitis by bacterial heat production in cerebrospinal fluid. *BMC Infect Dis*, v. 7, p. 116, 2007.

Tsankova, N.; Renthall, W.; Kumar, A.; Nestler, E. J. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*, v. 8, n. 5, p. 355-67, 2007.

Tsolia, M.; Psoma, M.; Gavrilis, S.; Petrochilou, V.; Michalas, S.; Legakis, N.; Karpathios, T. Group B streptococcus colonization of Greek pregnant women and neonates: prevalence, risk factors and serotypes. *Clin Microbiol Infect*, v. 9, n. 8, p. 832-8, 2003.

Tyler, K. L. Bacterial meningitis: an urgent need for further progress to reduce mortality and morbidity. *Neurology*, v. 70, n. 22 Pt 2, p. 2095-6, 2008.

Uttara, B.; Singh, A. V.; Zamboni, P.; Mahajan, R. T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol*, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2009.

Van De Beek, D.; De Gans, J.; Tunkel, A. R.; Wijdicks, E. F. Community-acquired bacterial meningitis in adults. *N Engl J Med*, v. 354, n. 1, p. 44-53, 2006.

Van De Beek, D.; Schmand, B.; De Gans, J.; Weisfelt, M.; Vaessen, H.; Dankert, J.; Vermeulen, M. Cognitive impairment in adults with good

recovery after bacterial meningitis. *J Infect Dis*, v. 186, n. 7, p. 1047-52, 2002.

Van Furth, A. M.; Roord, J. J.; Van Furth, R. Roles of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pathophysiology of bacterial meningitis and effect of adjunctive therapy. *Infect Immun*, v. 64, n. 12, p. 4883-90, 1996.

Verani, J. R.; Mcgee, L.; Schrag, S. J. Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep*, v. 59, n. RR-10, p. 1-36, 2010.

Vianna, M. R.; Alonso, M.; Viola, H.; Quevedo, J.; De Paris, F.; Furman, M.; De Stein, M. L.; Medina, J. H.; Izquierdo, I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem*, v. 7, n. 5, p. 333-40, 2000.

Waggener, J. D. The pathophysiology of bacterial meningitis and cerebral abscesses: an anatomical interpretation. *Adv Neurol*, v. 6, p. 1-17, 1974.

Watanabe, K.; Konishi, K.; Fujioka, M.; Kinoshita, S.; Nakagawa, H. The neutrophil chemoattractant produced by the rat kidney epithelioid cell line NRK-52E is a protein related to the KC/gro protein. *J Biol Chem*, v. 264, n. 33, p. 19559-63, 1989.

Weber, J. R.; Tuomanen, E. I. Cellular damage in bacterial meningitis: an interplay of bacterial and host driven toxicity. *J Neuroimmunol*, v. 184, n. 1-2, p. 45-52, 2007.

Willis, C. L.; Nolan, C. C.; Reith, S. N.; Lister, T.; Prior, M. J.; Guerin, C. J.; Mavroudis, G.; Ray, D. E. Focal astrocyte loss is followed by microvascular damage, with subsequent repair of the blood-brain barrier

in the apparent absence of direct astrocytic contact. *Glia*, v. 45, n. 4, p. 325-37, 2004.

Wuyts, A.; Proost, P.; Lenaerts, J. P.; Ben-Baruch, A.; Van Damme, J.; Wang, J. M. Differential usage of the CXC chemokine receptors 1 and 2 by interleukin-8, granulocyte chemotactic protein-2 and epithelial-cell-derived neutrophil attractant-78. *Eur J Biochem*, v. 255, n. 1, p. 67-73, 1998.

Xiao, W. Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. *Cell Mol Immunol*, v. 1, n. 6, p. 425-35, 2004.

Yamada, K.; Nabeshima, T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci*, v. 91, n. 4, p. 267-70, 2003.

Yancey, M. K. Prelabor Rupture of Membranes at Term: Induce or Wait? *Medscape Womens Health*, v. 1, n. 11, p. 2, 1996.

Yancey, M. K.; Duff, P.; Kubilis, P.; Clark, P.; Frentzen, B. H. Risk factors for neonatal sepsis. *Obstet Gynecol*, v. 87, n. 2, p. 188-94, 1996.

Zhang, R.; Brennan, M. L.; Shen, Z.; Macpherson, J. C.; Schmitt, D.; Molenda, C. E.; Hazen, S. L. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem*, v. 277, n. 48, p. 46116-22, 2002.

Zlokovic, B. V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, v. 57, n. 2, p. 178-201, 2008.

## **ANEXOS**



Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC

Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA



**Resolução**

O Comitê de Ética no Uso de Animais, reconhecido pela Resolução n. 04/2008/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou as aulas práticas abaixo.

**Protocolo: 55/2010**

**Professor:**

Tatiana Barichello

**Título: Níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e CINC-1 e integridade da barreira hemato-encefálica no cérebro de ratos neonatos e jovens submetidos à meningite bacteriana por *Streptococcus agalactiae*.**

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado ao CEUA. Os membros do CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Para demais dúvidas contatar o CEUA.  
[www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua).

Criciúma, 18 de novembro de 2010.

*Carina Rodrigues Boeck*

Coordenadora do CEUA